

UNIVERSITY OF HAWAII
LIBRARY
FEB 21 '51

EXPERIENTIA



REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores:

R. MATTHEY · A. v. MURALT · L. RUZICKA · J. WEIGLE
Lausanne Bern Zürich Genève-Pasadena

Redactor: H. MISLIN, Basel

VERLAG BIRKHÄUSER AG. · BASEL 10

SUISSE — SCHWEIZ — SVIZZERA — SWITZERLAND

SOMMAIRE - INHALT - SOMMARIO - CONTENTS

E. BOZLER: The Mechanism of Muscular Relaxation	1
A. ERNST: Muttergleiche Nachkommen nach interspezifischen Kreuzungen bei Blütenpflanzen	7

Brèves communications - Kurze Mitteilungen - Brevi comunicazioni - Brief Reports

L. ZECHMEISTER and J. H. PINCKARD: On Stereoisomerism in the Cyanine Dye Series	16	G. LUDÁNY, J. VAJDA und E. TÓTH: Cortison und die Leukozytenphagozytose	28
J. B. FINEAN: Phospholipid-Cholesterol Complex in the Structure of Myelin	17	J. COMSA: Rôle de la thyroïde dans l'action de la testostérone sur le thymus	29
A. ENGSTRÖM and B. ENGFELDT: Lamellar Structure of Osteons Demonstrated by Microradiography	19	F. TESTONI e G. LOMEO: L'azione di alcuni alcaloidi diidrogenati della segale cornuta nell'edema polmonare acuto sperimentale da adrenalina	30
R. FISCHER: The Selectivity of the Gram-stain for Keratins	20	F. TESTONI e V. MOSCATO: L'azione di alcuni alcaloidi diidrogenati della segale cornuta nell'edema polmonare acuto sperimentale da cloropirina	31
J. LINDENMANN: Die Röntgenschädigung von <i>Escherichia coli</i> bei 180 keV und 31 MeV	22	C. A. ROSSI, L. MONTANARI, M. MARTINELLI e G. MORUZZI: Ricerche sull'A.C.T.H. del sangue: Attività dell'ultrafiltrato	32
H. YANIV, Y. AVI-DOR, and A. L. OLITZKI: <i>In vitro</i> Development of Streptomycin Resistance in <i>Bacterium tularensis</i>	23	A. NOVELLI: New Method of Staining of Bacterial Capsules in Films and Sections	34
G. DÉNES: Die enzymatische Synthese des Glutamins im <i>Lupinus albus</i>	24	K. BIRN: Über Arbeitsstörungen bei serologischen Untersuchungen, verursacht durch ein Waschmittel (Pro Experimentis)	35
B. RYBAK et T. GUSTAFSON: Fécondation artificielle de <i>Xenopus laevis</i> sans sacrifice du géniteur mâle	25	K. LOTTENBACH, B. NOELPP und J. NOELPP-ESCHENHAGEN: Fortlaufende Venendruckregistrierung am Menschen mittels pneumatischer Druckübertragung (Pro Laboratorio)	36
H. DAM and EBBE SØNDERGAARD: Faster Action of Vitamin K ₁ than of Menadione and Synkavit Intravenously Injected into Vitamin K-deficient Chicks	26		
M. FUKUDA and A. SIBATANI: Nucleic Acids and Proteins in the Liver of Guinea Pigs Dying from Experimental Ascorbic Acid Deficiency	27		

Nouveaux livres - Buchbesprechungen - Recensioni - Reviews

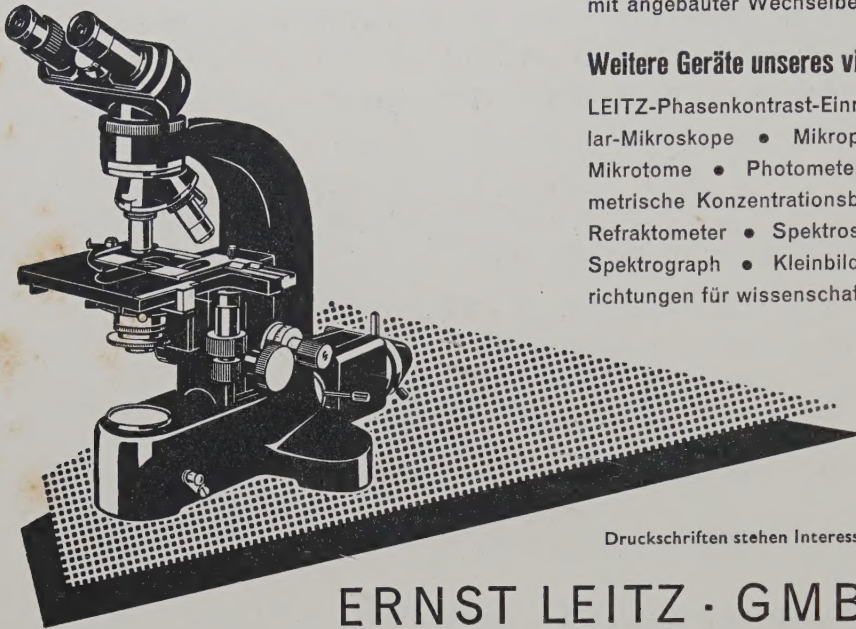
Statistical Decision Functions. By Abraham Wald (John Wiley & Sons, Inc., New York, 1950) (Ref. A. Kaelin)	38	Chemistry of Carbon Compounds. Edited by E. H. Rodd (Elsevier Publishing Co., Amsterdam, 1951) (Ref. H. Dahn)	39
Advances in Electronics. Edited by L. Marton (Academic Press, Inc., New York, 1948) (Ref. E. Baldinger)	38	Medicinal Chemistry. By Alfred Burger (Interscience Publishers, Inc., New York and London, 1951) (Ref. E. Berger)	39
Spectrochemical Analysis. By L. H. Ahrens (Addison-Wesley, Cambridge, U.S.A., 1950) (Ref. G. Ch. Amstutz)	39	Klinische Pathologie der Blutkrankheiten. Von R. Schoen und W. Tischendorf (Verlag G. Thieme, Stuttgart 1950) (Ref. H. Lüdin)	40

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

Nova	40
----------------	----

Leitz

Optische Instrumente



Mikroskope neuester Bauart mit eingebauter Beleuchtung:

DIALUX Forschungsmikroskop für Durchlicht • ORTHOLUX das Forschungsmikroskop für Durchlicht und Auflicht • PANPHOT Universal-Mikroskop für Durchlicht und Auflicht mit angebaute Wechselbeleuchtung und Spiegelreflexkamera.

Weitere Geräte unseres vielseitigen Fabrikationsprogramms:

LEITZ-Phasenkontrast-Einrichtung • Stereoskopische Binokular-Mikroskope • Mikrophotographische Einrichtungen • Mikrotome • Photometer für kolorimetrische und nephelometrische Konzentrationsbestimmungen • Polarimeter • Refraktometer • Spektroskop • Monochromator • Ultrarot-Spektrograph • Kleinbildkamera LEICA mit Ergänzungseinrichtungen für wissenschaftliche und technische Photographie.

Forschungsmikroskop DIALUX mit eingebauter Beleuchtung

Druckschriften stehen Interessenten auf Anforderung gern zur Verfügung.

ERNST LEITZ · GMBH · WETZLAR

Verzeichnis der Inserenten – Liste des annonceurs – List of Advertisers – Experientia IX/1

Ciba AG., Basel
Ernst Leitz GmbH., Wetzlar
Verlag Birkhäuser AG., Basel

Ganz & Co., Zürich
Sandoz AG., Basel

Schwitt AG., Basel
Lonza AG., Basel

*Die EXPERIENTIA kann in folgenden Ländern bei der Post abonniert werden:
EXPERIENTIA can be subscribed directly through any post-office in the following countries:*

Belgien, Luxemburg
Holland

Dänemark
Norwegen

Schweden
Finnland

Portugal
Marokko

Italien
Deutschland

L'EXPERIENTIA paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Abonnement pour un an 32 francs pour la Suisse; pour l'étranger 38 francs. Ces prix s'entendent en francs suisses.

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Ausland durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. Der Abonnementspreis beträgt in der Schweiz Fr. 32.-, im Ausland sFr. 38.-.

Insertionspreise: $\frac{1}{1}$ Seite Fr. 220.-, $\frac{1}{2}$ Seite Fr. 132.-, $\frac{1}{4}$ Seite Fr. 77.-. Inseratenannahme durch den Verlag.

EXPERIENTIA esce al 15 di ogni mese e può esser richiesta ad ogni libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. L'abbonamento annuo è di fr. 32.- per la Svizzera; all'estero fr. 38.-. I prezzi vanno intesi in valuta svizzera.

EXPERIENTIA is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The price by annual subscription by inland mail is fr. 32.-; other countries fr. 38.-. Prices in Swiss currency.

Prices for advertising: $\frac{1}{1}$ page fr. 220.-, $\frac{1}{2}$ page fr. 132.-, $\frac{1}{4}$ page fr. 77.-. Advertisements should be sent to the publishers.

Copyright 1953 by Verlag Birkhäuser AG., Basel 10 (Schweiz), Elisabethenstrasse 15, Telephon (061) 49800; Telegrammadresse: Edita Basel

Printed in Switzerland by E. Birkhäuser & Cie. AG., Basel

Zeitschrift für angewandte Mathematik und Physik

Journal of Applied Mathematics and Physics
Journal de Mathématiques et de Physique appliquées
ZAMP

Q1
A1B9

v. 9

Editores: J. ACKERET, E. BAUMANN, P. NIGGLI, P. SCHERRER, E. STIEFEL, F. STÜSSI, H. ZIEGLER.
Redaktor: R. SÄNGER

Inhalt von Nr. IV/1 (15. Januar 1953):

Zusammenfassende Berichte: H. LABHART: Antiferromagnetismus. – *Originalarbeiten:* TH. BRUNNER: Energiebedarf zur Verhütung von Vereisungen an Freileitungen. – H. RUTISHAUSER: Beiträge zur Kenntnis des Biorthogonalisierungs-Algorithmus von Lanczos. – M. WEBER: Theorie der Kombinationsseismographen. – *Kurze Mitteilungen:* H. TROESCH und P. GRASSMANN: Zum Verteilungsgesetz der Tropfengrößen bei der Zerstäubung. – *Varia:* International Union of Pure and Applied Physics (PERRIER). – *Buchbesprechungen.*

Jahresabonnement (6 Nummern): Inland Fr. 34.–, Ausland Fr. 40.–, Einzelnummer Fr. 8.–
Annual subscription (6 issues): Switzerland Fr. 34.–, other countries Fr. 40.–, single copy Fr. 8.–
Abonnement annuel (6 numéros): Suisse Fr. 34.–, étranger Fr. 40.–, le numéro Fr. 8.–

Verlangen Sie bitte auf Grund dieses Inserates eine Gratis-Probenummer

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung

VERLAG BIRKHÄUSER, BASEL, SCHWEIZ



*Clichés
in jeder Technik*

★ **SCHWITTER AG** ★

Basel / Zürich

NEUES **ZEISS-WINKEL** STANDARD-MIKROSKOP GF 525

Das Ergebnis einer hundertjährigen Tradition !

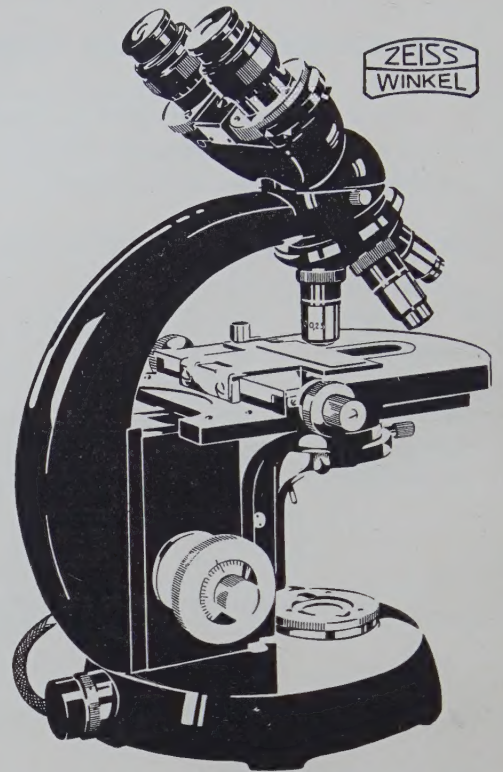
- Lichtstarke Einbaubeleuchtung (Köhlersches Prinzip) für subjektive Beobachtung und Mikrophotographie
- Tiefliegende, koaxial gelagerte Triebknöpfe für Grob- und Feineinstellung
- Grosser Kreuztisch mit koaxial gelagerten, links- und rechtsseitig angebrachten Triebknöpfen
- Vollkommener Präparatschutz durch gefederte Fassung der Objektive
- Vergrößerungswechsler für die Okulare (ohne Okularwechsel)
- Vereinigter Hellfeld-Phasenkontrast-Dunkelfeld-Kondensor
- Neue Achromate und Neofluare mit dezimal-geometrischer Abstufung der Vergrößerungen

Auskunft und Vorführung durch die
Generalvertretung für die Schweiz:

GANZ & Co

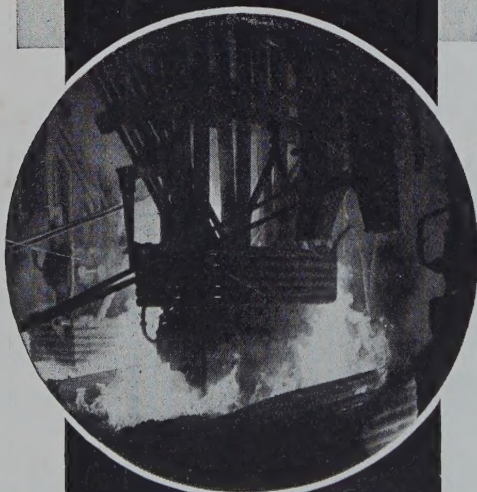
BAHNHOFSTR. 40
TEL. (051) 23 97 73

Zürich

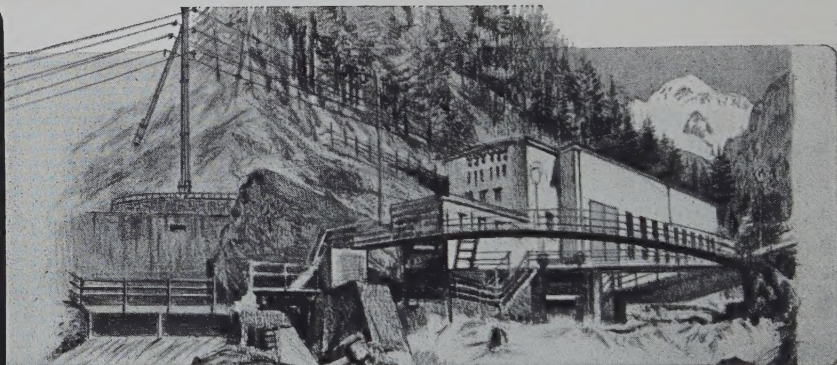


LONZA

ELEKTRIZITÄTWERKE
UND
CHEMISCHE FABRIKEN A.G.
BASEL



Karbidofen (Elektroden) im Werk Visp (Wallis)



Zentrale Gampel III in der Lonzaschlucht

Calcium-Carbid für Beleuchtungs-, Heiz- und Schweißzwecke

Metallegierungen: Ferrosilicium, Reinsilicium, Silico-Aluminium, Silico-Aluminium-Mangan — Graphit

Künstliche Schleifmittel: Siliciumcarbid, Lonsicar (Siliciumcarbid) für Hartbeton

Stickstoff-Dünger: Kalksalpeter, Ammonsalpeter, Ammonsulfat, Kalkstickstoff

Komplex-Dünger: Nitrophosphat, Nitrophosphatkali, Volldünger, Composto Lonza

Chemische Produkte: Formaldehyd, Acetaldehyd, Crotonaldehyd, Paraldehyd, Essigsäure, Essigsäureanhydrid, Natriumacetat, Dicyandiamid, Ammoniak, Salpetersäure, Nitriersäure, Natriumnitrit, Natriumnitrat, Harnstoff, Ammonnitrat, Nitrobenzol, Anilinöl

Organische Lösungsmittel: Aceton, Äthylacetat, Methyl- und Butylalkohol und deren Acetate, Speziallösungsmittel

Cellulose-Acetat

Vinylharze: Polyvinylchlorid, Polyvinylacetat, Polyvinylalkohol, Mischpolymerisate

The Mechanism of Muscular Relaxation

By EMIL BOZLER¹, Columbus, Ohio

Relaxation has not been investigated as systematically as contraction. Yet many fundamental problems of muscle physiology cannot be solved without some knowledge of this phenomenon. Before we can explain contraction we have to understand the physico-chemical properties of the muscle proteins at rest. We must know whether liberation of chemical energy is associated with contraction or relaxation. The important question has also been raised whether contraction can occur without relaxation and whether, therefore, in such cases relaxation must be initiated by the nervous system like contraction.

In a discussion of such fundamental questions it is imperative to marshal evidence from many sources. It is important to consider not only skeletal muscles, however favorable they may be in some respects, but also smooth muscles because they furnished important information on relaxation. An entirely new approach to this problem opened up through the use of simplified systems like extracted muscle fibers. These preparations, which we owe mainly to SZENT-GYÖRGYI², made it possible to reconstruct the basic phenomena of muscular activity, including relaxation, with the products of the disintegration of tissues and thereby have given some insight into the nature of relaxation on a molecular level. In this review it will be attempted to synthesize the information which has been gained by these different approaches.

Contraction without Relaxation: The Tonus Problem

It has often been postulated that in some muscles contraction represents a state, called tonus, which is maintained without energy expenditure. In other words, it is assumed that relaxation is not automatically coupled with contraction as it is in skeletal muscle.

The most important argument for such a "catch mechanism" has been the observation that some smooth muscles can remain in a contracted state for long periods of time. However, this observation is not sufficient evidence for the hypothesis because the slow onset of fatigue is adequately explained by the slowness

of the response of smooth muscle¹. Measurements of heat production in isolated smooth muscles have actually shown that maintenance of tension requires continuous energy expenditure, but many times less than in striated muscle². The differences between these muscles, therefore, evidently are quantitative. This question has previously been discussed in greater detail³. A physico-chemical explanation of the high economy of smooth muscle will be given below.

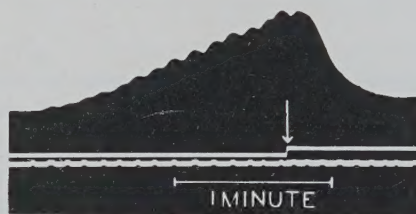


Fig. 1.—Inhibition in muscle of blood vessels of frog's leg. Each electric shock to sympathetic (lower signal) produced a response until blocked by stimulation of dorsal roots (upper signal).

The assumption of a special tonus mechanism can be tested still in another manner. If tonus is contraction without relaxation it must be assumed that relaxation is actively initiated by the nervous system like contraction. In some muscles, particularly smooth muscle, stimulation of certain efferent fibers indeed cause relaxation, an observation which has been frequently mentioned to support the hypothesis of a distinct tonus mechanism. Let us examine, therefore, our present knowledge of the nature of inhibition of smooth muscle by peripheral nerve fibers.

This problem was studied on the blood vessels of the frog's legs⁴. Their responses were recorded by a sensitive flowmeter which measured the flow of perfusion fluid. A sustained contraction of the smooth muscle was elicited by stimulating the sympathetic trunk with single stimuli applied at intervals of a few seconds. If now the vasodilator fibers in the dorsal roots were stimulated, the muscle relaxed completely. Figure 1

¹ A. D. RITCHIE, *The Comparative Physiology of Muscle* (Cambridge University Press, London, England, 1928).

² E. BOZLER, *J. Physiol.* **69**, 442 (1930).

³ E. BOZLER, *Exper.* **4**, 213 (1948).

⁴ E. BOZLER, *Am. J. Physiol.* **117**, 457 (1936).

¹ Department of Physiology of the Ohio State University.

² A. SZENT-GYÖRGYI, *Chemistry of Muscular Contraction* (Academic Press, New York, 1951).

shows that this effect was produced because the inhibitory impulses blocked the responses to the vasoconstrictor impulses.

In another type of experiment the effect of the vasodilator impulses was imitated by adding acetylcholine in low concentrations (10^{-7} to 10^{-8}) to the perfusion fluid¹. This drug also blocked the responses to single shocks but after several stimuli in rapid succession the muscle contracted (Fig. 2). During inhibition, therefore, the muscle can respond, but only after previous facilitation.

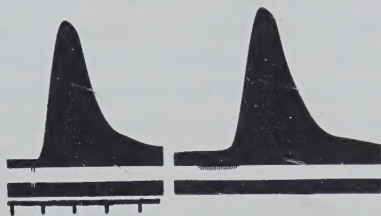


Fig. 2.—Effect of acetylcholine on responses of blood vessels of rabbit's ear. Signal indicates single stimuli to auricular nerve. On right acetylcholine ($2 \cdot 10^{-8}$) was added to perfusion fluid. Time: 10 s.

Experiments on visceral smooth muscles throw additional light on the nature of inhibition. In these muscles excitability is diminished or abolished, during inhibition². However, under normal conditions, inhibition does not stop the initiation of impulses. This is shown by the observation that in the stomach and intestine rhythmic electric activity continues while all visible movements have ceased³. Also the amplitude of the action potentials usually is not diminished during inhibition; but their shape is altered strikingly. In the stomach of the dog⁴ for instance, the duration of the monophasic potential is reduced from about 6 s to as little as 1 s (Fig. 3). This effect is similar to the shortening of the potential of the auricle produced by vagal stimulation or acetylcholine, but it is much more extreme in smooth than in cardiac muscle. Also in the skeletal muscles of crustaceans the discharge of muscular action potentials may continue during inhibition⁵.

These studies show clearly that inhibition causes relaxation by diminishing or suppressing the ability to respond. In no case has a process been demonstrated which actively terminates a state of contraction such as it must be postulated on the assumption that tonus is a state of contraction without energy expenditure.

Recently new arguments have been advanced to support the idea of tonus as a state of contraction without relaxation. It has been reported that glycerol extracted muscle fibers stay contracted after a con-

traction induced by adenosine triphosphate (A.T.P.) even after A.T.P. has been washed out. The opinion was expressed that this represents a state of contraction without relaxation. In the meantime, however, this argument has been invalidated because it has been shown that such preparations do relax, although very slowly, suggesting that maintenance of tension requires the continuous breakdown of A.T.P.¹.

Another argument is based on the observation that in the adductor muscle of *Mytilus* a strong shock can break up a sustained contraction produced by strong direct current². However, it is also possible to stop fibrillation of the heart with a strong shock. Surely, no far reaching conclusions can be drawn from such findings without further analysis.

The hypothesis of a tonic contraction without energy expenditure, originally advanced by BETHE and PARNAS, has been very fruitful because it has dramatically emphasized the great differences in the properties of muscles, but it may be questioned whether at present, in the absence of any acceptable evidence, it is still a profitable basis for discussion.

It need not be assumed, however, that all sustained muscular activity consists in a regular discharge of brief impulses. Tetanic contractions are a peculiarity mainly of skeletal muscles. In smooth muscles, states of excitation lasting for many seconds often occur³.

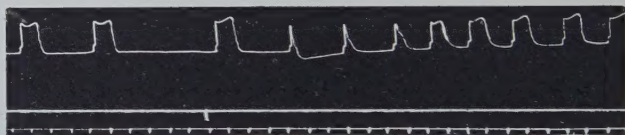


Fig. 3.—Action potentials from stomach of dog. Each wave represents a monophasic potential of one peristaltic wave. At signal 0.03 mg adrenaline was injected intravenously causing shortening of each potential and increased frequency of discharge. Time: 5 s.

Furthermore, there are not only all or none conducted responses but also slow non-propagated contractions which play a role in the initiation of conducted impulses⁴ and perhaps in responses elicited by drugs. All these types of activity involve a depolarization of the cell surface and liberation of energy and, therefore, are not basically different from tetanic contractions.

Molecular Mechanism of Relaxation

Role of A.T.P. The state of relaxation is characterized by the softness of the muscle fibers and their readiness to respond to stimuli. What are the physical

¹ E. BOZLER, unpublished.

² E. BOZLER, *Am. J. Physiol.* **130**, 627 (1940).

³ E. BOZLER, *Am. J. Physiol.* **146**, 496 (1946).

⁴ E. BOZLER, *Am. J. Physiol.* **144**, 5 (1945).

⁵ G. MARMONT and C. A. G. WIERSMA, *J. Physiol.* **93**, 173 (1938).

¹ E. BOZLER, *Am. J. Physiol.* **167**, 276 (1951). — H. H. WEBER, *Z. Elektrochem.* **55**, 511 (1951).

² F. R. WINTON, *J. Physiol.* **88**, 492 (1937). — A. V. HILL, *Nature* **166**, 415 (1950). — C. A. G. WIERSMA, *Ann. Rev. Physiol.* **14**, 159 (1952).

³ E. BOZLER, *Am. J. Physiol.* **136**, 553 (1942).

⁴ E. BOZLER, *Exper.* **4**, 213 (1948).

and chemical factors producing this state of the contractile elements? To answer this question would be to explain the nature of the living cell, but some significant observations on this problem have been made recently.

When the muscle fibers die, their physical properties change strikingly; they become less extensible, more opaque and, usually, they also shorten slightly. SZENT-GYÖRGYI and others have come to the conclusion that this state, called rigor, is caused by the disappearance of A.T.P. This assumption is strikingly confirmed by the observation that under certain conditions muscle fibers can be transformed by A.T.P. from a state of rigor into one closely resembling normal relaxation¹. Muscle fibers which were washed in water or preserved in glycerol were used in these experiments. Such fibers become translucent and plastic (Fig. 4) in suitable solutions containing A.T.P. and then contract rapidly and vigorously if a small amount of CaCl_2 is added. The whole activity cycle of muscle can be closely imitated with such non-living muscle fibers by first bringing about a relaxed state by A.T.P., then eliciting a contraction by Ca-ions, washing out these ions and finally causing relaxation again by A.T.P., as shown in Figure 5. The similarity with the cycle of normal muscle is enhanced by the observation that A.T.P.-ase activity is weak in the relaxed state and increases several fold on addition of Ca-ions².



Fig. 4.—Softening action of A.T.P. on extracted muscle fibers. Record of tension (increase downward). At *a*, fibers were stretched 10 per cent; at *b*, fibers in 1 per cent A.T.P., causing rapid drop in tension; at *c*, fibers stretched 50 per cent; at *d*, 30 per cent. Time: 15 min.

The relaxing effect of A.T.P. may seem surprising because previously A.T.P. has always been found to cause contraction. Actually A.T.P. can produce contraction or relaxation depending on certain conditions. Relaxation is obtained only in muscle fibers which have been stored for not more than a few days and only if Mg-ions are present (1 to 10 mM/liter).

How does A.T.P. transform the contractile elements from a state of rigor to one of relaxation? SZENT-GYÖRGYI has postulated that in the relaxed state the contractile protein actomyosin is combined with A.T.P.

The following observations confirm this assumption. If muscle fibers which had been brought into a relaxed state by A.T.P. are washed with a KCl solution containing Mg-ions, they remain in a relaxed state for some minutes. Although no free A.T.P. is present, the fibers differ strikingly from those in rigor:

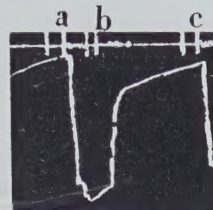


Fig. 5.—Activity cycle of muscle as reproduced in extracted muscle fibers. At *a*, CaCl_2 (0.5 mM/liter) caused a contraction in fibers previously brought into a relaxed state by A.T.P. At *b*, fibers were washed with saline. A.T.P. subsequently again caused rapid relaxation. At *c*, CaCl_2 caused another contraction.

(1) they remain highly extensible and translucent; (2) they do not respond to A.T.P.; (3) addition of small amounts of Ca-ions (0.1 mM/liter) causes rapid contraction (Fig. 6). These observations show clearly that A.T.P. is still present in the washed fibers, but in chemical combination with the contractile proteins, forming an enzyme-substrate complex. Because contraction, although a weaker one, can also be elicited by removing Mg-ions, it is probable that also this ion takes part in the formation of the A.T.P.-protein complex and is necessary for its stability.

The relaxing effect of A.T.P. is not unexpected in view of previous studies on muscle proteins¹. Under certain conditions A.T.P. lowers the viscosity of actomyosin solutions, an effect which has been shown to be due to dissociation of this protein into actin and myosin. SZENT-GYÖRGYI has considered this effect as analogous to relaxation. His conclusion that actomyosin is in a partially dissociated state during relaxation is in good agreement with the effect of A.T.P. on the mechanical properties of the contractile elements.

Mechanical force causing relaxation. Relaxation reverses the configurational change during contraction. What is the force responsible for this effect?

According to a widely accepted theory contraction is due to the tendency of long oriented molecules to assume a more random configuration. Because in such a mechanism the mechanical work released is furnished by an increase in entropy, the molecular arrangement can be restored only by release of chemical energy during relaxation. It is generally assumed in this theory that relaxation is caused by electrostatic repulsion between charged groups. KUHN and HARGITAY² actually devised

¹ E. BOZLER, *Am. J. Physiol.* 168, 760 (1952).

² E. BOZLER, unpublished.

¹ A. SZENT-GYÖRGYI, *Chemistry of Muscular Contraction* (Academic Press, New York, 1951).

² W. KUHN and B. HARGITAY, *Exper.* 7, 1 (1951).

a model which imitates muscular contraction and relaxation and works on a mechanism of this type.

The role of electrostatic forces has been tested experimentally as follows¹. Under physiological conditions the charges of the protein molecules are largely neutralized by ions. Washing out electrolytes, therefore, considerably increases the total charge of the protein. This can be accomplished conveniently in glycerol extracted muscle fibers. It was found that such fibers shorten slightly when they are brought into distilled water, never relax as would be expected if electrostatic repulsion were a factor in relaxation. Furthermore, large changes in pH, which also change the charge of the protein, have no effect on the length of the fibers.

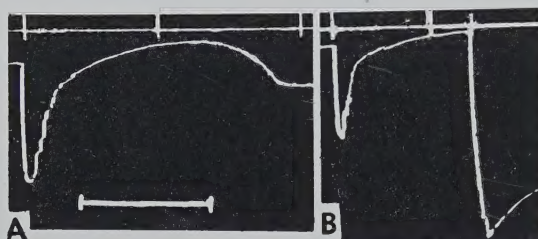


Fig. 6.—Effects of washing out A.T.P. from relaxed, extracted muscle fibers. One per cent A.T.P. caused transient contraction (first signal). After washing out A.T.P. (second signal) tension continued to drop. In A, rigor developed later and addition of calcium ions (third signal) had no effect. In B, calcium ions (0.5 mM/liter) were added earlier, producing contraction. Time: 15 min.

That relaxation is passive has been demonstrated beyond any doubt by numerous observations. It has been shown, for instance, that relaxing substances not only speed up relaxation but also the isometric loss of tension after passive stretch and that in every case the speeds of these two processes are the same, suggesting that both are due to the same physical forces². Particularly striking is also the fact that rapid relaxation can be brought about reversibly not only by A.T.P. but also by pyrophosphate^{2,3} and urea². The last of these substances certainly cannot furnish energy, but is known to loosen up the structure of proteins generally, probably by splitting hydrogen bonds. That breaking up of bonds within the contractile elements is responsible for relaxation is confirmed by the fact that relaxing substances make the fibers very soft and transparent².

Studies on normal muscles also support the conclusion that relaxation is passive. In smooth muscles it has been found that the time course of isometric relaxation agrees with that of the loss of tension after stretch in the resting muscle⁴ (Fig. 7). In his well known

myothermic studies HILL has shown for striated muscle that no heat is produced during relaxation except under condition where mechanical work previously produced is converted into heat within the muscle.

However, in striated muscle relaxation is more complex than in smooth muscle, as shown by the observation, that the physical properties of striated muscle change during relaxation, in contrast to smooth muscle. Extensibility which has been shown¹ to drop suddenly at the beginning of contraction, rises during relaxation and does not return to the resting value in striated muscle until relaxation is complete² (Fig. 8). Also, after a quick stretch tension drops in this type of muscle to its equilibrium value much faster than during relaxation. Relaxation of striated muscle, therefore, is not a purely physical process.

No direct information is available on chemical processes during relaxation, but observations on extracted muscle fibers suggest the following explanation. It will be recalled that in these fibers relaxation involves the formation of an A.T.P.-protein complex. Following contraction, during which A.T.P. breaks down, this complex must be restored. It may be assumed that this process, which is possibly due to the presence of free A.T.P., governs the rate of relaxation in striated muscle and causes the rise in extensibility. In smooth muscle relaxation undoubtedly also depends on such a process, but actual relaxation is much slower because a viscous force within the contractile elements opposes extension. The existence of such a force is revealed by a study of the mechanical properties of the relaxed muscle which we shall consider now.

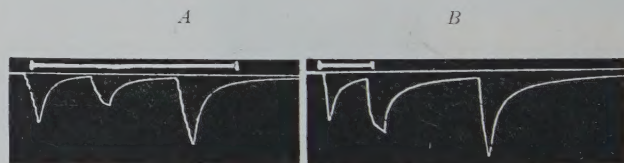


Fig. 7.—Comparison between the drop in tension after extension and after contraction in smooth muscle (retractor of pharynx of snail). In A, first isometric contraction (air). Then the muscle was stretched 25 per cent. After isometric loss of tension, another isometric contraction at new length. In B, muscle was in 6 per cent CO₂ which increased viscosity and slowed relaxation. Time: 30 s. Note difference in time scale in A and B.

Mechanical properties of the contractile elements at rest. The mechanical properties of normal striated muscle are largely those of its supporting elements³. The study of extracted muscle fibers, however, has furnished important information on our problem. As mentioned before, such fibers, which are in a state of rigor, become very extensible, almost like normal relaxed muscle, after treatment with A.T.P. and other

¹ E. BOZLER, J. Gen. Physiol. 35, 703 (1952).

² E. BOZLER, Am. J. Physiol. 167, 276 (1951).

³ H. H. WEBER, Z. Elektrochem. 55, 511 (1951).

⁴ E. BOZLER, Z. vgl. Physiol. 14, 429 (1931). — E. BOZLER, J. Cell. Comp. Physiol. 18, 385 (1941).

¹ A. V. HILL, Proc. roy. Soc. London [B] 136, 211 (1949).

² E. BOZLER, J. Cell. Comp. Physiol. 8, 419 (1936).

³ E. BOZLER, Biol. Symposia 4, 260 (1936).

relaxing substances, an effect which certainly must be attributed to the contractile elements themselves.

It is significant that these fibers, after they have been brought into a state resembling relaxation, differ mechanically from normal muscle in one point. A load attached to such a preparation does not cause sudden extension. Instead, after a small, purely elastic, extension the fibers lengthen slowly¹ (Fig. 9). Furthermore, their original length is not restored after unloading. This slow yielding under a load has often been observed in normal, relaxed smooth muscle. It is one of the most impressive and important, but little appreciated, observations on muscle. It shows that the contractile elements are plastic and that resistance of a viscous type opposes lengthening.

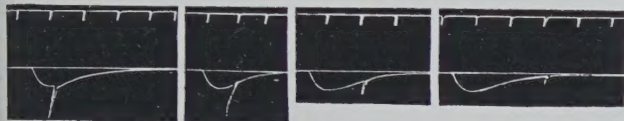


Fig. 8.—Extensibility of striated muscle during different phases of relaxation. The curves represent twitches of the retractor penis of turtle. A quick stretch (2 mm) caused a transient rise in tension. The effect decreased during relaxation. Time: 1 s [J. Cell. Comp. Physiol. 8, 419 (1936)].

What is the cause of this viscous resistance? For smooth muscle it has generally been thought that it is produced by a highly viscous fluid within the muscle fibers. However, the effect of A.T.P. on extracted muscle fibers shows that viscous effects are caused by the contractile proteins themselves. It is unlikely also that these effects are produced by the displacement of the contractile molecules, because extension reverses the configurational changes caused by contraction. Viscous resistance, therefore, probably is intramolecular, caused by weak bonds within the protein molecules which are formed after shortening and which are broken during extension. HILL² has described a possible molecular mechanism which accounts for plasticity and other properties of the contractile elements and which helps to visualize the processes under discussion. Figure 10 based on HILL's suggestion, illustrates how extension of the contractile elements can produce viscous resistance. It is assumed that active groups of the contractile proteins, when they come close together during active contraction, form bonds, such as hydrogen bonds, which oppose extension, but are so weak that they can be broken by a small mechanical force. The diagram accounts for the elastic and viscous effects produced by stretching and for the fact that the physical state of the contractile elements and their readiness to respond are not appreciably modified by

changes in length. This scheme is merely intended to illustrate the nature of the problem. The plasticity of the contractile elements presents questions which cannot be answered satisfactorily until more is known about the structure of proteins.



Fig. 9.—Extension of extracted muscle fibers by a load. At ↓ a load of 2 g was applied, at ↑ it was removed. On left preparation was in saline; on right in 0.5 per cent A.T.P. Time: 5 s.

The explanation of viscous resistance presented here at once brings into focus many of the observation mentioned above. In the relaxed state the contractile protein is combined with A.T.P. After the removal of A.T.P. active groups of the protein become free to form intra- and intermolecular bonds. This causes syneresis, shortening, and increased rigidity and opacity, the properties characteristic for rigor. After application of A.T.P., pyrophosphate and urea these bonds become weaker again, but never as weak as in normal muscle, giving rise to "viscous" effects. During storage the strength of the bonds increases further, making relaxation due to A.T.P. progressively slower until finally the relaxing effect of A.T.P. is completely abolished.

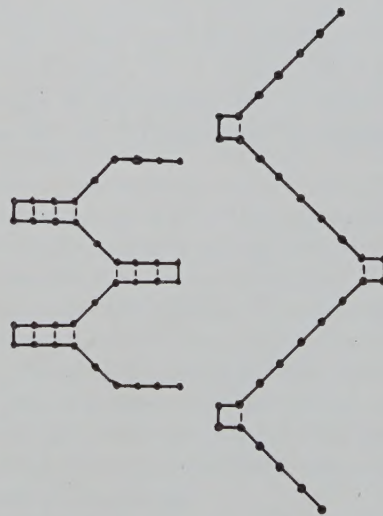


Fig. 10.—A possible molecular mechanism of extension of contractile elements. Black dots represent active groups of protein which form secondary bonds with each other when chains are folded.

Also some properties of normal smooth muscle can be explained on this basis. Because intramolecular bonds which tend to maintain the shortened state of the contractile elements are strong in these muscles, relaxation is slow and the energy expenditure during

¹ E. BOZLER, *Am. J. Physiol.* (in press).

² A. V. HILL, *Proc. roy. Soc. London [B]* 136, 420 (1949).

sustained contractions is low. The strength of these bonds may change and is different in different muscles. In the snail's retractor, for instance (not in vertebrate smooth muscle), a manifold increase is produced by low concentrations of CO_2 or by previous activity, a condition favorable for maintaining tension economically. Physiological differences between different types of muscle, therefore, can be explained as the result of quantitative differences in the properties of the contractile proteins.

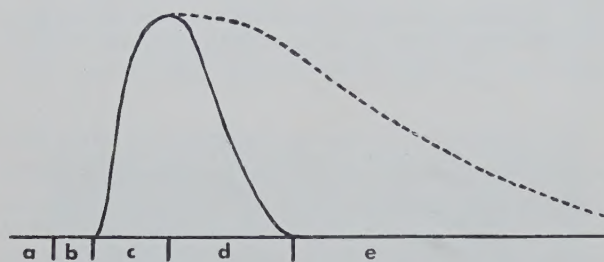


Fig. 11.—Sequence of molecular changes during muscular response in striated muscle (full line), and smooth muscle (broken line).—*a* Relaxed state. Dissociated actin-myosin-A.T.P.-Mg complex.—*b* Latent period. Ca-ions cause formation of actomyosin-A.T.P. complex, decreased extensibility.—*c* Increased breakdown of A.T.P., release of mechanical energy.—*d* Reconstitution of the actin-myosin-A.T.P.-Mg complex and passive extension of contracted elements.—*e* In smooth muscle continued passive extension opposed by viscous resistance.

It remains to fit the processes responsible for relaxation into the remaining part of the activity cycle of muscle. In Figure 11 an attempt has been made to arrange the molecular processes during the response of muscle chronologically. It is assumed with SZENT-GYÖRGYI that at rest actomyosin is combined with A.T.P. and partly dissociated (*a*). At the beginning of

contraction Ca-ions cause myosin and actin to combine firmly, making the muscle more rigid, perhaps also producing latency relaxation (*b*). This causes increased breakdown of A.T.P. and release of mechanical energy (*c*). During relaxation A.T.P. again combines with actomyosin, causing partial dissociation and increased extensibility. An external force, if present, then can distend the contracted protein chains rapidly (*d*). In striated muscle the last two of these processes go on simultaneously. In smooth muscle, on the other hand, intramolecular bonds resisting passive extension are rather firm and further slow down relaxation (*e*).

Zusammenfassung

Die Annahme eines Kontraktionszustandes ohne Energiebedarf (Tonus) hat keine experimentelle Grundlage. Die durch hemmende Nervenfasern bewirkte Erschlaffung von glatten Muskeln beruht nicht auf einer aktiven Beendigung eines Kontraktionszustandes, sondern auf einer Verminderung der Reizbeantwortung der Muskelfasern. In Gegenwart von Mg-Ionen verwandelt ATP. starre Muskelfasern in einen Zustand ähnlich dem des normalen ruhenden Muskels. Diese Wirkung beruht auf einer chemischen Verbindung des ATP. mit dem kontraktilem Protein. Kleine Mengen von Ca-Ionen steigern die enzymatische Tätigkeit in solchen Fasern und führen eine Kontraktion herbei. Erschlaffung ist passiv, aber in quergestreiften Muskeln wird die Geschwindigkeit der Erschlaffung von einem chemischen Vorgang, wahrscheinlich der Wiederherstellung des ATP.-Proteinkomplexes, beherrscht. In extrahierten Muskelfasern und in normalen glatten Muskeln ist die Erschlaffung ausserdem verzögert durch einen viskosen Widerstand, der durch schwache, intramolekulare Bindungen verursacht wird. Die Stärke dieser Bindungen ist verschieden in verschiedenen Muskeln und bestimmt wichtige physiologische Eigenschaften der glatten Muskeln, besonders die Geschwindigkeit der Erschlaffung und den Energiebedarf während einer Dauerkontraktion.

Muttergleiche Nachkommen nach interspezifischen Kreuzungen bei Blütenpflanzen¹

Von ALFRED ERNST, Zürich

Bastarde und ihre Nachkommen vereinigen Merkmale und Eigenschaften ihrer beiden Eltern. Diese Aussage stimmt nur mit Einschränkungen. Sie ist richtig, wenn Vater und Mutter naheverwandten systematischen Einheiten, wie reinen Linien, Sippen, Varietäten oder Unterarten derselben Linnéschen Art, angehören. Nur für die Nachkommen solcher Elternpaare ist die Gültigkeit der in neuester Zeit wieder so viel diskutierten «Vererbungsgesetze», besser gesagt der sogenannten Mendelschen Vererbungsregeln, – mehr oder weniger – sichergestellt. Auch nach Kreuzungen zwischen verschiedenen Linnéschen Arten von Pflanzen und Tieren werden ersichtlich einzelne Merkmale nach diesen Regeln übertragen. Darüber hinaus liegen die Verhältnisse bei den Blütenpflanzen wesentlich anders als bei den Tieren. Bastardierung spielt beim Zustandekommen der Formenmannigfaltigkeit in der Pflanzenwelt eine ungleich wichtigere Rolle als im Tierreich.

In der systematischen und genetischen Zoologie sind Kreuzungsmöglichkeit und Kreuzungsunmöglichkeit – Interkompatibilität und Inkompatibilität – für die Abgrenzung der Arten innerhalb grosser Formenkreise wohl ausschlaggebend. Bei den Pflanzen sind die Grenzen für Kreuzungsmöglichkeiten wesentlich weiter. Der Nachweis der Kreuzbarkeit guter Arten ist schon von LINNÉ durch die Kreuzung von *Tragopogon pratensis* ♀ mit *Tragopogon porrifolius* ♂ aufgezeigt worden. Die sich anschliessende botanische Bastardforschung des 18. und der ersten Hälfte des 19. Jahrhunderts sah ihr Ziel fast ausschliesslich in der Erzeugung von Artbastarden. Durch den Nachweis der Kreuzbarkeit von Arten hat KOELREUTER² überhaupt erst den einwandfreien Nachweis geschlechtlicher Differenzierung und Fortpflanzung der Gewächse erbracht. Über Artbastarde berichten in der Hauptsache die Untersuchungen von GÄRTNER³, die *Nouvelles recherches sur l'hybridité*

dans les végétaux von NAUDIN¹, und sie sind auch Hauptgegenstand der umfassenden Darstellung aller vorangegangenen Bastardforschungen in dem Werk FOCKES² über die Pflanzenmischlinge. Die Kreuzungsmöglichkeit zwischen Arten derselben Gattung und sogar von Arten verschiedener Gattungen ist durch die ältere Bastardforschung in jeder Hinsicht sichergestellt. Sie hat auch bereits aufgezeigt, dass die pflanzlichen Art- und Gattungsbastarde in der Angleichung an die Erscheinungsform der Eltern sich sehr verschieden verhalten. Lange nicht alle Artbastarde nahmen die anfänglich erwartete intermediäre Stellung zwischen den Eltern ein; der einen oder anderen Elternart ähnliche Bastarde hatten sich als relativ häufig erwiesen.

Hatte man sich im 19. Jahrhundert mit der blossen Feststellung dieser verschiedenen Übereinstimmungsgrade zwischen Eltern und Nachkommen begnügt, so wurden nach 1900, also nach der Wiederentdeckung der Mendelschen Regeln und dem nachfolgend raschen Aufstieg der experimentellen Vererbungsforschung, die Untersuchungen über die Fertilitätserscheinungen der Artbastarde, die Entstehung und Zusammensetzung ihrer Nachkommenschaften – Konstanz oder Aufspaltung – zu einem besonderen, auf das Evolutionsproblem gerichteten Zweige der Vererbungsforschung. Die Kombination embryologisch-zytologischer und experimentell-genetischer Forschung ergab, dass die als *einseitige*, mutter- oder vatergleiche Bastarde bezeichneten Nachkommen aus interspezifischen Bestäubungen eine sehr verschiedene Entstehung haben können. Nur ein kleiner Teil derselben verdankt seinen Ursprung *Kreuzbefruchtungen*; wohl die grössere Zahl der für Bastarde gehaltenen elterngleichen Nachkommen ist *nicht* amphimiktischen Ursprungs.

Über geschlechtlich erzeugte elternähnliche oder elterngleiche Nachkommen können wir uns – verglichen mit denjenigen anderer Entstehungsmöglichkeiten – kurz fassen.

DE VRIES³ hat Bastarde, welche mehr nach dem

¹ Zusammenfassung und Diskussion der Resultate einiger mit Subventionen der J.-Klaus-Stiftung für Vererbungsforschung, Sozialanthropologie und Rassenhygiene in Zürich durchgeführten und im «Archiv» der Stiftung (Band 26, 1951/52) bereits publizierten und noch zu publizierenden genetischen Untersuchungen.

² J. G. KOELREUTER, Leipzig 1761–1766; OSTWALDS Klassiker, Nr. 41 (Verlag W. Engelmann, Leipzig 1893).

³ C. F. GÄRTNER, *Bastardaerzeugung im Pflanzenreich* (Verlag K. F. Hering & Co., Stuttgart 1849).

¹ M. CH. NAUDIN, Ann. Sci. nat. Bot. [4], 19, 180–203 (1863).

² W. O. FOCKE, *Die Pflanzenmischlinge* (Verlag Gebr. Bornträger, Berlin 1881).

³ H. DE VRIES, *Mutationstheorie*, 2. Bd. (Verlag Veit & Co., Leipzig 1903), S. 20.

einen oder andern Elter hinneigen, als *goneoklin*, diejenigen, welche den Typus eines der beiden Eltern – mit Ausschluss des andern – aufweisen, als *einseitig* bezeichnet. In neuerer Zeit sind diese Bezeichnungen durch *metro-* und *patroklin* und *metro-* und *patromorph* ersetzt worden. Sie entstehen nach den Ergebnissen der neueren Bastardanalysen (vgl. z. B. RENNER¹) zumeist dann, wenn in den interspezifischen Kreuzungen die prävalierenden Merkmale zur Hauptsache oder ganz von einem der beiden Eltern stammen. Es handelt sich also um amphimiktisch entstandene Bastarde mit mehr oder weniger vollständiger Dominanz des mütterlichen oder väterlichen Phänotypus. Vollständige Übereinstimmung zwischen dem einen Elterntypus und dem einseitigen Bastard ist nach Kreuzung von Arten zu erwarten, die sich in wenigen Merkmalen unterscheiden. Je grösser die Zahl der differentiellen Merkmale, um so geringer ist die Wahrscheinlichkeit, dass ihre dominanten Alternativen derselben Elternform zukommen, um so seltener also auch eine vollkommene Übereinstimmung der Bastarde mit der einen Elternart.

Besonders häufig sind *einseitige* Bastarde als Nachkommen aus Kreuzungen zwischen Arten mit *verschiedener Chromosomenzahl* erhalten worden. Zumeist hat die Art mit der grösseren Chromosomenzahl auch den grösseren Einfluss auf den Phänotypus des Mischlings. Die ersten sichern Angaben über solche einseitige Bastarde gehen auf MILLARDETS² Kreuzungsversuche mit *Fragaria*-Arten zurück, auf eine Zeit, da die später als so wichtig erkannte Korrelation zwischen Chromosomenzahl und Kreuzungseignung noch gänzlich unbekannt war. MILLARDET hat den hybridogenen Ursprung der von ihm erhaltenen, zumeist metromorphen, seltener patromorphen Nachkommen nach Kreuzungen zwischen den europäischen *Fragaria*-Arten unter sich und mit Kulturformen amerikanischer Arten verneint und sie als «faux hybrides» und den Vorgang ihrer Entstehung als «fausse hybridation» bezeichnet. Die Millardetschen Angaben haben schon bald nach Beginn der modernen Erblchkeits- und Bastardforschung berechtigtes Interesse gefunden und zur Nachprüfung und Aufklärung angeregt. Es ist nicht möglich, an dieser Stelle die anderorts bereits gegebenen Übersichten über den jetzigen Stand der *Fragaria*-Bastardforschung³ zu wiederholen. Es ist zweifellos richtig, dass in der Gattung *Fragaria* nach interspezifischen Bestäubungen *neben* oder an Stelle echter Artbastarde muttergleiche oder mutter- und vatergleiche Nachkommen entstehen, wenn auch vorsichtigerweise gesagt werden muss, dass ihre zytologischen Belange auch heute noch sehr unübersichtlich und ungeklärt geblieben sind.

Weitaus die grosse Mehrzahl der früher als einseitige Bastarde («maternal hybrids») bezeichneten Nachkommen aus interspezifischen Bestäubungen gehen nicht aus der Vereinigung von Gameten der beiden gekreuzten Arten hervor. Sie sind nicht *amphimiktischen*, sondern *apomiktischen* Ursprungs und beruhen auf *spontaner oder durch die Fremdbestäubung induzierter Samen- und Embryobildung*. Vier verschiedene Haupttypen ihrer Entstehung sind nunmehr nachgewiesen:

1. muttergleiche Nachkommen nach Kreuzungen an und mit autonom-apomiktischen Arten;
2. muttergleiche Nachkommen nach Kreuzungen infolge induziert-apomiktischer Samenbildung (Pseudogamie);
3. muttergleiche Nachkommen nach Kreuzungen durch induzierte *Haplo*-Parthenogenesis;
4. muttergleiche Nachkommen nach Kreuzungen durch induzierte *Diplo*-Parthenogenesis.

Von diesen vier Typen sind 1 und 2 durch unzählige Untersuchungen nachgewiesen und auch längst aus umfassenden Gesamtdarstellungen¹ bekannt. Sie sind im nachfolgenden nur zur Sicherung von Übersicht und Zusammenhang kurz charakterisiert. Eingehender behandelt wird der dritte Typus der Entstehung muttergleicher Nachkommen infolge induzierter *Haplo*-Parthenogenesis und schliesslich, insbesondere auf Grund der Resultate der eigenen Untersuchungen, Entstehung und Bedeutung von Nachkommenschaften aus interspezifischen Bestäubungen an intraspezifisch obligat sexuellen Arten durch hybridogen induzierte *Diplo*-Parthenogenesis dargelegt.

1. Muttergleiche Nachkommen nach interspezifischen Bestäubungen an und mit autonom-apomiktischen Arten

Gleichzeitiges Auftreten muttergleicher Nachkommen neben typischen Bastarden nach interspezifischen Bestäubungen ist bekanntlich erstmals von MENDEL² in den Nachkommenschaften aus seinen Kreuzungen mit *Hieracium*-Arten festgestellt worden. Ihre Aufklärung haben sie wenige Jahre nach der Wiederentdeckung der Mendelschen Regeln durch die Feststellung von OSTENFELD³ gefunden, dass verschiedenen Arten der Gattung *Hieracium* die mehr oder weniger stark ausgeprägte Fähigkeit zur *Samenbildung ohne Befruchtung* zukommt. ROSENBERG⁴ hat dann den Nachweis geführt, dass diese Arten befähigt sind, neben haploidkernigen, befruchtungsbedürftigen Embryosäcken in mehr oder weniger zahlreichen Blüten ihrer Blütenstände diploidkernige Embryosäcke mit parthenogenetischer Embryo-Entwicklung zu bilden. Das wechselnde Zahlenverhältnis von muttergleichen Nachkom-

¹ O. RENNER, *Handbuch der Vererbungswissenschaft*, Bd. II, Lief. 7 (II, A) (Verlag Gebr. Bornträger, Berlin 1929), S. 16.

² M. A. MILLARDET, *Mém. Soc. Sci. phys. nat. Bordeaux* 4, 361 (1894).

³ A. ERNST, *Bastardierung als Ursache der Apogamie im Pflanzenreich* (Verlag G. Fischer, Jena 1918), S. 368; *Maternal hybrids* 2., Arch. J.-Klaus-Stiftg., Zürich 26, 277 (1952).

¹ Å. GUSTAFSSON, *Apomixis in higher plants*, Lunds Univ. Årsskr. N. F. 42 und 43 (1946/47).

² G. MENDEL, *Verh. nat. Verein Brünn* 8, 26 (1869).

³ C. H. OSTENFELD, *Bot. Tidsskr.* 27, 225 (1906).

⁴ O. ROSENBERG, *Bot. Tidsskr.* 28, 143 (1907).

zwischen *Primula elatior* und *veris* erhalten hat: "The proportion of good pollen produced by the haploids is small (7,5%), though the few good grains were rather large and well formed; no seed was set when the plants were used as female parents in back-crosses".

Verglichen mit der Zahl der in den Fruchtknoten vorhandenen Samenanlagen und der Anzahl der vorgenommenen Kreuzbestäubungen ist das Ergebnis der Versuche VALENTINES, 14 Nachkommen, wovon 2 haploid, zahlenmässig sehr bescheiden. Eine mehr oder weniger konstante Mutationsrate ist weder für diese noch für die andern bisherigen Angaben über das Auftreten haploider Nachkommen nach interspezifischen Bestäubungen zu errechnen. Der Ursprung dieser Haplonten aus haploidkernigen Eizellen ist ausserordentlich wahrscheinlich – ein direkter zytologischer Nachweis dafür aber nicht wohl zu erbringen.



Abb. 1. Interspezifische Bestäubungen zwischen Arten des *Wilsoni*- und des *Beesiana*-Typus in der *Primula*-Sektion *Candelabra*. Lang- und Kurzgriffel von *Pr. Poissonii* subsp. *Wilsoni* (1a und b) und von *Pr. Beesiana* (2a und b). Die interspezifisch-legitimen Bestäubungen sind mit → bezeichnet. Längshalbierte Blüten 2/1 natürliche Grösse.

Die «maternal hybrids» in den Nachkommenschaften aus unseren eigenen, in grösserem Maßstabe durchgeführten interspezifischen Bestäubungen innerhalb der *Primula*-Sektionen *Candelabra* und *Farinosae* sind nicht nur bei Fremd-, sondern auch bei Selbstbestäubungen vollkommen fertil. Sie haben dieselben Chromosomenzahlen wie die Mutterpflanzen, können also nicht wohl als Haplo-Mutanten entstanden sein und auf induzierter Haplo-Parthenogenesis beruhen. Sie stimmen zwar mit Haplo-Typen in den ersten Entwicklungsstadien durch die oft auffallend geringe Vitalität, da-

gegen nicht im endgültigen Habitus und in der Fertilität überein. Die Blüten der haploiden «Scheinbastarde» sind fast immer steril, während unsere «maternal hybrids» der tetraploid-monomorphen *Primeln* nach Selbstungen und Fremdbestäubungen, diejenigen der diploid-dimorphen Arten, wie *Pr. Wilsoni*, nach legitimen Fremdbestäubungen, volle Fertilität aufweisen. Das dürfte am einfachsten durch die Annahme induzierter Diplo-Parthenogenesis zu erklären sein. Sehr wahrscheinlich werden nach gewissen interspezifischen Bestäubungen an normalerweise sich geschlechtlich fortpflanzenden Blütenpflanzen haplo- und diplo-parthenogenetische Eientwicklung in wechselndem Zahlenverhältnis gleichzeitig ausgelöst. Es ist also in keiner Weise ausgeschlossen, ja ausserordentlich wahrscheinlich, dass in unseren Nachkommenschaften aus den interspezifischen Bestäubungen unter den «maternal hybrids» auch solche Haplo-Typen enthalten gewesen sind. Unter der grossen Zahl der nicht zu voller Entwicklung gekommenen und ebenso der scheinbar normal entwickelten, aber nicht keimenden Samen dürften neben einer Mehrzahl mit diploidkernigen Embryonen auch solche mit reduzierter Chromosomenzahl vorhanden gewesen sein. Vielleicht waren auch einzelne der zur Entwicklung gekommenen, aber schwach gebliebenen Nachkommen, die gerade infolge ihrer Schwächlichkeit nicht zu Bestäubungen Verwendung fanden, solche Haplonten.

Für die Entstehung diploidkerniger Eizellen in haploidkernigen Embryosäcken geschlechtlich normaler Blütenpflanzen, die sodann infolge des Bestäubungsreizes wie die Gewebe der Frucht- und Samenanlagen zur Weiterentwicklung angeregt werden, sind verschiedene Möglichkeiten denkbar. Sie sind an anderer Stelle¹ eingehend diskutiert worden und können hier nur summarisch genannt werden. Es sind:

a) das Ausbleiben der Reduktionsteilung in vereinzelter Embryosack-Mutterzellen oder Ablauf einer semiheterotypischen Teilung und Bildung eines Restitutionskernes;

b) Entstehung diploidkerniger Eizellen durch Automixis, das heisst Kernverschmelzungen in der Eizellenregion haploidkerniger Embryosäcke;

c) Embryo-Entwicklung aus einer unter dem Einfluss der von Bestäubung und Pollenschlauch-Wachstum ausgehenden Reize diploidkernig gewordenen Eizelle eines haploidkernigen Embryosackes; akzidentell oder exzeptionell hybridogen ausgelöste Diplo-Parthenogenesis.

Die nach interspezifischen Bestäubungen vom Pollen verschiedener Arten ausgehenden, entwicklungserregenden Reize sind offenbar ungleich stark und kommen in einer verschieden rasch und verschieden weitgehenden Entwicklung von Frucht- und Samenanlagen sichtbar zum Ausdruck. Es ist anzunehmen, dass nach

¹ A. ERNST, Arch. J.-KLAUS-Stiftg. Zürich 26, 284 (1952).

einzelnen Elternkombinationen diese Reizwirkungen sich auch im haploidkernigen Embryosack geltend machen und wenigstens teilweise die sonst durch die Befruchtung ausgelösten Entwicklungsvorgänge zu stimulieren vermögen. In welcher Weise dabei die Diploidisierung der Eizellen verläuft, muss hier unter Hinweis auf die eingehende Diskussion in der ausführlichen Arbeit unerörtert bleiben. Dagegen sei im nachfolgenden eingehend auseinandergesetzt, auf Grund welcher Befunde die «maternal hybrids» aus den durchgeführten interspezifischen Bestäubungen als Nachkommen hybridogen induzierter Diplo-Parthenogenesis bezeichnet worden sind.

4. Muttergleiche Nachkommen
nach Kreuzungen durch induzierte Diplo-Parthenogenesis

Völlig metromorphe Nachkommen mit absoluter Fertilität und konstant bleibender Nachkommenschaft als Resultat interspezifischer Bestäubungen an und zwischen normal sexuellen Arten widersprechen der allgemeinen Erwartung. Sie sind aber im Verlaufe der drei letzten Jahrzehnte in einer grösseren Zahl von Versuchsserien mit verschiedenen Blütenpflanzen, insbesondere nach Kreuzungen von Arten mit verschiedenen Chromosomenzahlen, bald in kleiner, bald in grösserer Zahl erhalten worden. Unerwartete Ergebnisse von Kreuzungsexperimenten machen sorgfältige Überprüfung aller irgendwie in Frage kommenden Fehlermöglichkeiten zur selbstverständlichen Pflicht. Für die Entstehung einseitiger mütterlicher Nachkommen oder «maternal hybrids», wie sie immer wieder genannt wurden, schienen vor allem zwei Möglichkeiten in Frage zu kommen: apomiktische Entstehung und Entstehung aus ungewollten intraspezifischen Bestäubungen und Befruchtungen als Folge fehlerhafter Versuchsdurchführung. Es spricht durchaus für die gewissenhafte und unbefangene Selbstkritik in der genetischen Forschung, dass zu verschiedenen Malen, auch von seiten hervorragender Genetiker, wie BUXTON und DARLINGTON¹ und A. und G. MÜNTZING², «experimental errors» und «unsuccessful emasculation and self pollination» als Ursache angenommen und auf die Diskussion anderer Möglichkeiten ohne weiteres verzichtet worden ist.

So war ich also in ausgezeichneten Gesellschaft, als ich in der ersten Mitteilung über die Resultate der eigenen Kreuzungsversuche an und mit *Pr. helodoxa* und *Wilsoni* aus der *Primula*-Sektion *Candelabra* die kurze Diskussion über die Entstehung einiger weniger muttergleicher Nachkommen mit dem Satze schloss³: «Die aus interspezifischen Bestäubungen an *Pr. helodoxa* und *Wilsoni* erhaltenen Nachkommen (insgesamt 15 Pflanzen) sind sehr wahrscheinlich keine Bastardnachkommen. Sie gehen in ihrer Entstehung – wahrscheinlich als auf Parthenogenesis, Apogamie oder

Pseudogamie – auf vereinzelt gebliebene Selbstungen an den Versuchspflanzen zurück.» Eine erneute Stellungnahme drängte sich auf, als bei den ausgedehnten und mit grösster Sorgfalt vorbereiteten und durchgeführten Kreuzungen zwischen der tetraploid-monomorphen *Pr. japonica* und zahlreichen andern *Candelabra*-Arten sich mit aller Deutlichkeit drei verschiedene Effekte der hybridogenen Bestäubungen feststellen liessen:

- a) vollständiges Versagen der Bestäubungen an diploid-monomorphen und dimorphen Arten mit Pollen der tetraploiden *Pr. japonica* in bezug auf Entstehung keimfähiger Samen;
- b) Entstehung echter Bastarde nach Bestäubungen von *Pr. japonica* mit Pollen kurzgrifflicher *Pr. burmanica*;
- c) Entstehung von «maternal hybrids» nach Bestäubungen innerhalb zweier Sippen von *Pr. japonica* mit Pollen anderer, monomorpher und dimorpher Arten.



Abb. 2. Interspezifische Bestäubungen zwischen Arten des *Beesia*- und des *Helodoxa*-Typus in der *Primula*-Sektion *Candelabra*. Lang- und Kurzgriffel von *Pr. helodoxa* (1a und b) und von *Pr. pulverulenta* (2a und b). Die interspezifisch-legitimen Bestäubungen von Langgriffeln mit Pollen von Kurzgriffeln und von Kurzgriffeln mit Pollen von Langgriffeln sind mit → bezeichnet. Längshalbierte Blüten 2/1 natürliche Grösse.

Nach Darlegung der Resultate dieser grossen Versuchsreihe und einer entsprechenden Versuchsserie, die schon lange zuvor im Formenkreis der Mehlprimeln¹ durchgeführt worden war, habe ich den Nachweis zu erbringen versucht, dass zum mindesten in den drei Gattungen *Solanum*², *Digitalis*³ und *Primula*⁴, in

¹ B. H. BUXTON und C. DARLINGTON, New Phytologist 31, 225, (1932).
² A. und G. MÜNTZING, Bot. Not. Lund 1945, 49.
³ A. ERNST, Arch. J.-Klaus-Stiftg. Zürich 19, 310 (1944).

¹ A. ERNST in: Festschrift C. SCHRÖTER (Verlag Rascher & Co., Zürich 1925). S. 628.
² C. A. JØRGENSEN, J. of Genetics 19, 133 (1928).
³ G. HAASE-BESSELL, Z. ind. Abstammungs- u. Vererbungslehre 27, 1; 42, 1 (1921 und 1926). – N. YAKAR, Rev. Fac. Sci. Un. Istanbul 9, 106; 14, 287 (1945 und 1949).
⁴ A. ERNST, Arch. J.-Klaus-Stiftg. 26, 3 und 187 (1951/52).

denen nach interspezifischen Bestäubungen *einseitige* «Bastarde» mit konstant bleibender Nachkommenschaft erhalten worden sind, die muttergleichen F_1 -Pflanzen nicht auf «experimental errors» beruhen können, sondern durch induzierte Diplo-Parthenogenese entstanden sind.

Für diese Versuchsreihen grossen Umfangs dürfte der Nachweis erbracht sein, dass die muttergleichen Nachkommen nicht auf ungewollte Bestäubungen zurückgehen und für ihre Entstehung auch die unter 1 und 2 kurz charakterisierten Möglichkeiten apomiktischer Fortpflanzung nicht in Frage kommen. Als Belege seien an dieser Stelle nur die wichtigsten Resultate unserer Untersuchungen an den Primeln angeführt und besprochen.

In drei verschiedenen Versuchsserien sind aus interspezifischen Bestäubungen muttergleiche Nachkommen erhalten und ihre Frequenz aus der Relation der bestäubten Blüten zur Zahl der blühenden Nachkommen bestimmt worden.

Von Bedeutung ist, dass bei den Kreuzungen mit Arten der *Primula*-Sektion *Candelabra* muttergleiche Nachkommen in zwei ihrem Wesen nach stark verschiedenen Elternkombinationen erhalten worden sind.

a) Kreuzungen diploid-dimorpher *Candelabra*-Arten verschiedener Blütentypen und geringer interspezifischer Kompatibilität. Die Arten des *Helodoxa*- und des *Wilsoni*-Typus (vgl. Abb. 1 und 2) als Mutterpflanzen zeichnen sich nach Bestäubungen mit Arten eines dritten, des *Beesiana*-Typus, durch ungewöhnlich geringe interspezifische Kompatibilität aus.

Pr. Wilsoni zum Beispiel ist in auffallendem Grade selbstfertil, und zwar sowohl an ihren Lang- wie Kurz-

griffeln. Aus interspezifischen Bestäubungen dagegen, insbesondere mit Pollen von Arten des *Beesiana*-Typus (vgl. Abb. 1) und ebenso nach Bestäubungen mit diploid-monomorphen Arten, sind in grosser Zahl wohl parthenokarpe Früchte, aber nur ausnahmsweise Früchte mit einigen wenigen keimfähigen Samen hervorgegangen.

Von 61 Samenproben aus solchen interspezifischen Bestäubungen haben nur deren 10 mit zusammen 1048 Samen 77 Keimlinge und 21 blühende Pflanzen geliefert. Die Keimlinge hatten nicht die volle Vitalität des mütterlichen Elterntypus, und die blühenden Pflanzen zeigten – haploiden Mutanten vergleichbar – eine verminderte Fertilität und gingen frühzeitig ein.

Die Zahl der blühenden Nachkommen war je legitime, arteigene Bestäubung an *Pr. Wilsoni* ± 10 , je Selbstung an Kurzgriffeln ± 8 und je Selbstung an Langgriffeln ± 5 . Die muttergleichen Nachkommen aus den interspezifischen Bestäubungen blieben mit nur 0,32 bis 1,167 Nachkommen je bestäubter Blüte nicht nur hinter den legitimen intraspezifischen Fremdbestäubungen, sondern auch hinter den illegitimen Selbstbestäubungen weit zurück.

Noch viel bescheidener blieb das Gesamtergebnis der interspezifischen Bestäubungen an Lang- und Kurzgriffeln von *Pr. helodoxa* als Samenträgern. Aus 91 Bestäubungen mit *Pr. Beesiana* sind wohl 77 Früchte mit 4063 mehr oder minder gut entwickelten Samen, aus den 1806 Samen der 45 bestentwickelten Früchte aber nur 2 Keimlinge erhalten worden, die nicht entwicklungsfähig waren. 80 Bestäubungen mit *Pr. pulverulenta* (vgl. Abb. 2) gaben 68 Früchte mit 3229 Samen; von 1843 Samen aus 54 Früchten keimten 26; 2 der-



Abb. 3. Interspezifische Kreuzungen zwischen der tetraploid-monomorphen *Pr. japonica* und der diploid-dimorphen *Pr. burmanica* und die beiden Typen in der F_1 -Nachkommenschaft aus der Bestäubung *japonica* «rose pink» ♀ mit *burmanica* kurzgriffelig ♂. *Pr. japonica* «rose pink» (1); *Pr. burmanica* lang- und kurzgriffelig (2a und b); die beiden Phänotypen (langgriffelig mit hoher Antherenstellung und kurzgriffelig mit hoher Antherenstellung) der F_1 -Bastarde (3a und b); → interspezifisch-legitime, ...→ interspezifisch illegitime Bestäubungen. Längshalbierte Blüten 2/1 natürliche Grösse.

selben konnten zu blühenden, muttergleichen Pflanzen aufgezogen werden. Auch für diese Elternkombination beträgt die Nachkommenschaft nur 0,025 je bestäubte Blüte.

Pr. Wilsoni und *Pr. helodoxa* sind bis jetzt die einzigen dimorphen *Primula*-Arten, die nach interspezifischen Bestäubungen mit Arten eines andern Blütentypus, aber innerhalb derselben Sektion der Gattung, nur «maternal hybrids» als Nachkommenschaft liefert haben.

b) Die Kreuzungen zwischen der tetraploid-monomorphen *Pr. japonica* mit diploid-mono- und -dimorphen *Candelabra*-Arten. Von den reziproken Bestäubungen zwischen diploid-mono- und -dimorphen Arten an und mit der tetraploid-monomorphen *Pr. japonica* hatten ausschliesslich Kombinationen mit der tetraploiden *Pr. japonica* als Samenpflanze Erfolg. Aus den Bestäubungen mit der diploid-dimorphen *Pr. burmanica* als Pollenspender sind triploide Bastarde (vgl. Abb. 3) erhalten worden. Die grosse Mehrzahl der Bestäubungen mit den diploid-monomorphen Arten *Pr. Cockburniana* und *chungensis*, ebenso mit der diploid-dimorphen *Pr. pulverulenta* als Pollenspender, ergaben wohl parthenokarpe Früchte, aber keine keimfähigen Samen. Immerhin erwiesen sich die *japonica*-Sippen «rose pink» und «deep red» für artfremden Pollen empfänglicher als die Versuchspflanzen aus anderen verwendeten Sippen. Ausser mehr oder weniger gut entwickelten parthenokarpen Früchten sind auch einzelne Früchte mit einer kleinen Anzahl meistens recht gut entwickelter Samen erhalten worden. Die Zahl der aus Bestäubungen mit den drei genannten Arten erhaltenen Nachkommen ist aber, bezogen auf die Zahl der vorgenommenen Bestäubungen und der auf Keimfähigkeit geprüften Samen, klein geblieben. Von 31 Samenproben mit insgesamt 8042 Samen haben nur deren 8 mit zusammen 310 Samen 115 Keimlinge und schliesslich 48 blühende Nachkommen ergeben. Alle waren «maternal hybrids». Sie stimmten im Fertilitätsgrad ihrer Selbstungen und in der Vitalität mit den Mutterpflanzen überein. Die aus den Samen von Selbstungen aufgezogenen F_2 -Familien waren wieder reine *Pr. japonica* «deep red» und «rose pink».

Für die Nachkommenschaften von *japonica* «deep red» war die Zahl der «maternal hybrids» 75–755mal, für diejenigen von *japonica* «rose pink» 13–111mal kleiner als die Nachkommenschaft aus intraspezifischen Bestäubungen.

Die echten Bastarde, die aus den interspezifischen Bestäubungen an *Pr. japonica* «rose pink» mit *Pr. burmanica* erhalten worden waren, waren triploid und spalteten in bezug auf die Heterostylie-Merkmale in homostyle Langgriffel und «normale» Kurzgriffel

(Abb. 3, 3a und b) auf. Die «maternal hybrids» aus den Bestäubungen mit allen andern dimorphen Arten und ebenso mit den diploid-monomorphen Partnern dagegen waren wieder tetraploid und monomorph, mit gleich hoher Stellung von Narbe und Antheren.

c) Die Kreuzungen zwischen einer tetraploid-monomorphen und diploid-dimorphen Arten der *Primula*-Sektion *Farinosae*. Aus den interspezifischen Bestäubungen an der tetraploid-monomorphen *Pr. longiflora* mit Pollen der diploid-dimorphen Arten *Pr. farinosa* und *rosea* sind ebenfalls nur muttergleiche Nachkommen erhalten worden. Frucht- und Samenbildung an *Pr. longiflora* waren nach den interspezifischen Bestäubungen mit Pollen von *Pr. farinosa* und *rosea* lang- und kurzgriffelig ungefähr derselben Grössenordnung. In der Kombination *Pr. longiflora* ♀ und *farinosa* kurzgriffelig ♂ (vgl. Abb. 5) wurden zum Beispiel nach Bestäubung von 350 Blüten an 131 Pflanzen 10 samenhaltige Früchte (2,86% der Bestäubungen) mit zusammen 191 Samen erhalten (normale mittlere Samenzahl aus intraspezifischen Bestäubungen 200!). In den Elternkombinationen *longiflora* ♀ und *rosea* lang- und kurzgriffelig ♂ (vgl. Abb. 6) wurden von 299 bestäubten Blüten 19 Früchte mit 384 Samen geerntet.

Insgesamt sind aus interspezifischen Bestäubungen an *Pr. longiflora* mit Pollen von *Pr. farinosa* und *rosea* lang- und kurzgriffelig 82 blühende Nachkommen erhalten worden. Allen ging der Bastardcharakter völlig ab; der Gesamthabitus und ganz speziell der Blütenbau sprachen durchaus für die Zugehörigkeit zur Mutterart *Pr. longiflora*.

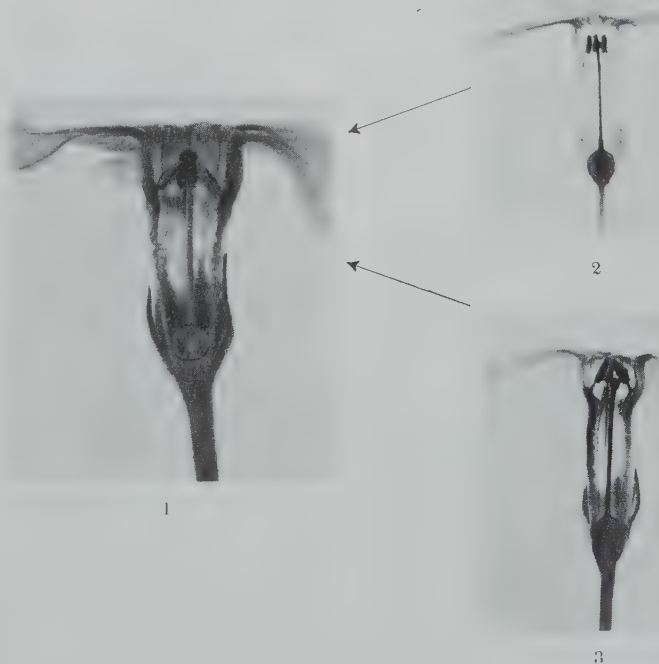


Abb. 4. Interspezifische Bestäubungen zwischen der tetraploid-monomorphen *Pr. japonica* und den diploid-monomorphen Arten *Pr. Cockburniana* und *chungensis*. *Pr. japonica* (1); *Pr. Cockburniana* (2); *Pr. chungensis* (3). Frucht- und Samenbildung nur bei Verwendung von *Pr. japonica* als Samenträger. Längshalbierte Blüten 2/1 natürliche Grösse.

Aus jeder der aufgezogenen 10 F_1 -Familien sind je eine oder mehrere Pflanzen auf ihre Fertilität geprüft und aus einem Teil des erhaltenen Samenmaterials F_2 -Nachkommen aufgezogen worden. Alle 60 Probanden erwiesen sich in den Resultaten der Selbstungen und intraspezifischen Fremdbestäubungen der Mutterart durchaus gleichwertig. 52 Samenproben mit zusammen 21871 Samen kamen zur Aussaat. Die Gesamtzahl der blühenden F_2 -Nachkommen war 2455, alle typische *longiflora*.

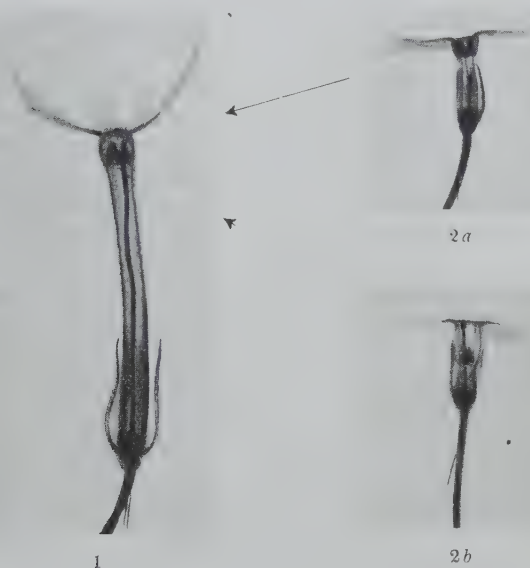


Abb. 5. Interspezifische Bestäubungen zwischen der tetraploid-monomorphen *Pr. longiflora* als Samenträger und der diploid-dimorphen *Pr. farinosa* als Pollenspender. *Pr. longiflora* (1) und *Pr. farinosa* (2a und b). Längshalbierte Blüten 2/1 natürliche Grösse.

Die Beziehungen zwischen Bestäubungsmodus, Frucht- und Samenbildung, Keimkraft der Samen und Vitalität der Nachkommenschaft sind durch Berechnung von *Fertilitäts-* und *Reproduktionsquotienten* und ihrer Mittelwerte verglichen worden. Für *Pr. longiflora* als Samenträger zum Beispiel besagen die Mittelwerte der *Fertilitätsquotienten*, dass Frucht- und Samenbildung nach den interspezifischen Bestäubungen mit *Pr. farinosa* und *rosea* 46–76mal geringer, diejenigen der *Reproduktionsquotienten* dagegen, dass Keimkraft und Vitalität der Nachkommenschaft aus diesen Samen gleich oder nicht viel geringer sind als für die Samen aus intraspezifischen Bestäubungen. Für die Resultate der Bestäubungen an den F_1 -Nachkommen aus den interspezifischen Bestäubungen an *longiflora* dagegen sind die Mittelwerte sowohl der *Fertilitäts-* wie der *Reproduktionsquotienten* mehr oder weniger gleich denjenigen der elterlichen *Pr. longiflora*.

Die Zahl der Nachkommen aus den interspezifischen Bestäubungen an zwei tetraploid-monomorphen Arten aus verschiedenen Sektionen der Gattung *Primula* ist *grosso modo* je bestäubte Blüte 5–10‰ der Nachkommenschaft aus Selbstungen der Elternart. Für die Ver-

gleichung der Häufigkeit muttergleicher Nachkommen nach Artkreuzungen in der Gattung *Primula* mit den Befunden in andern Verwandtschaftskreisen der Angiospermen, zum Beispiel der Resultate der von JØRGENSEN durchgeführten *Solanum*-Kreuzungen sowie der *Digitalis*-Kreuzungen von YAKAR, ist die Relation Zahl der bestäubten Blüten zur Zahl der blühenden Nachkommen durch das Verhältnis Zahl der Samenanlagen in den bestäubten Blüten zur Zahl der blühenden Nachkommen zu ersetzen. Für die beiden Primeln dürfte darnach bei einer mittleren Zahl von 250 Samenanlagen je Fruchtknoten auf 1000–10000 Samenanlagen zwar eine grössere Zahl mehr oder weniger gut ausgebildeter und auch teilweise keimfähiger Samen, aber selten mehr als ein blühender Nachkomme zu erwarten sein. Für die muttergleichen Nachkommen aus interspezifischen Bestäubungen in der Gattung *Solanum* liegt in der Mitteilung von JØRGENSEN ein statistisch allerdings viel weniger sicherndes Resultat vor. Aus der Kreuzung *Solanum nigrum* mit *luteum* sind zum Beispiel aus 90 Bestäubungen 43 Früchte mit insgesamt 70 Samen erhalten worden. Die Zahl der aufgezogenen Nachkommen betrug 35, von denen 7 als haploide und nur 28 als diploide «maternal hybrids» ausgewiesen waren. Die mittlere Samenzahl spontan entstandener Früchte von *Solanum nigrum* dürfte ± 50 sein. Auf etwa 4500 Samenanlagen der 90 bestäubten Blüten kamen 28 diploide, muttergleiche Nachkommen, auf 160 befruchtungsfähige Samenanlagen also 1 blühender Nachkomme.

Für die *Digitalis*-Kreuzungen von YAKAR sind wesentlich günstigere Resultate erhalten worden. Die von ihm als Partner verwendeten beiden Arten sind nicht diploid und tetraploid, dagegen hat die eine der beiden, *Digitalis ferruginea*, haploid 35, *Digitalis purpurea* dagegen nur 28 Chromosomen, der Bestäubungstypus ist pentaploid $\text{♀} \times \text{tetraploid} \text{♂}$. Die vielfach bestätigte Regel, dass bei Kreuzungen zwischen Polyploidien nur die chromosomenreichere Art als Mutterpflanze – wenn überhaupt – keimfähige Samen ergibt, hat auch in den Resultaten der *Digitalis*-Kreuzungen erneut Bestätigung gefunden. Nach Bestäubungen *Digitalis ferruginea* $\text{♀} \times \text{Digitalis purpurea}$ ♂ war die Zahl mehr oder weniger normal ausgewachsener Früchte weniger als 25%. Die Zahl der Samen betrug kaum 1 je Bestäubung und auch nur 4 je reife Frucht, während *Digitalis ferruginea* nach Selbstungen etwa 200, *Digitalis purpurea* sogar 1600 Samen je Frucht produzieren sollen. Von den Einzelresultaten sei nur dasjenige der Versuchsjahre 1940/41 wiedergegeben: 115 bestäubte Blüten, 62 Früchte, wovon 26 samenhaltig mit zusammen 215 Samen. 77 Samen keimten, 11 blühende Pflanzen wurden erhalten, also 1 blühender Nachkomme auf mindestens 2000 Samenanlagen.

In allen drei Gattungen, in denen bis anhin die grössten Zahlen von «maternal hybrids» nach interspezifischen Bestäubungen nachgewiesen worden sind, bleibt

die Zahl der Nachkommen innerhalb der Grössenordnung von einem halben bis wenige Promill der befruchtungsfähigen Samenanlagen. Das bedeutet für experimentelle Untersuchungen ein ausserordentlich bescheidenes Resultat, für das Naturgeschehen aber doch ein in mehrfacher Hinsicht auch für die Erhaltung und Verbreitung der Arten nicht zu vernachlässigendes Ergebnis.

In eingehender Diskussion der nach interspezifischen Bestäubungen in der Gattung *Primula* erzielten Resultate ist versucht worden, die Entstehung der «maternal hybrids» in das System der Fortpflanzungsvorgänge bei Angiospermen einzuordnen. Es dürfte wohl der Beweis erbracht worden sein, dass von den als Parthenogenesis zusammengefassten apomiktischen Fortpflanzungsvorgängen die meisten für Entstehung muttergleicher Nachkommen weder bei Primeln noch bei andern normal sexuellen Angiospermen in Frage kommen können. In Betracht zu ziehen sind nur Vorgänge echter Parthenogenesis in haploidkernigen, nach normalem Verlauf der Reduktionsteilung entstandenen Embryosäcken. Akzidentelle Auslösung sowohl haploider wie diploider Parthenogenesis sind für *Primula* und *Solanum* nachgewiesen und dürften auch in andern Verwandtschaftskreisen mit «maternal hybrids» als deren Ursache erkannt werden.

Auch in den beiden Gattungen *Primula* und *Solanum* sind haploide Mutanten, wie in andern Verwandt-

schaftskreisen, fast immer steril. In den Meiosen ihrer Blüten unterbleibt die Geminibildung ganz oder teilweise. Dagegen weisen die «maternal hybrids» der untersuchten monomorphen Primeln nach Selbstungen und Fremdbestäubungen, diejenigen dimorpher Arten, wie *Pr. Wilsoni* und *helodoxa*, nach legitimen Fremdbestäubungen volle Fertilität auf. Sie haben dieselben Chromosomenzahlen wie ihre Mutterpflanzen, können also nicht als Haplo-Mutanten entstanden sein. Am einfachsten fällt ihre Erklärung durch Annahme einer Entstehung durch hybridogen ausgelöste Diplo-Parthenogenesis, wie sie in den Gattungen *Solanum* und *Digitalis* auch durch embryologisch-zytologische Untersuchungen bestätigt worden ist. «Maternal hybrids» ähnlichen Ursprungs dürften in allen Verwandtschaftskreisen sexuell normalfunktionierender Angiospermen erhalten werden, in denen interspezifische Bestäubungen zwischen Arten verschiedener Genom- oder Chromosomen-Grundzahlen möglich sind.

Es wäre vermessen, nach Feststellung und «Erklärung» des Modus parthenokarper Fruchtbildung, der Ausbildung der Integumente der Samenanlage zur Samenschale und der Entstehung eines diploidkernigen Embryos inmitten eines mehr oder weniger funktionsfähigen Endosperms das Problem der «maternal hybrids» als gelöst betrachten zu wollen. Es bleiben die Teilprobleme beschränkter Keimfähigkeit der in den Fruchtknoten mehr oder weniger normal entwikk-



Abb. 6. Reziproke interspezifische Bestäubungen zwischen der tetraploid-monomorphen *Pr. longiflora* und der diploid-dimorphen *Pr. rosea*. *Pr. longiflora* (1) und *Pr. rosea* (2a und b); → interspezifisch-legitime, - - -> interspezifisch-illegitime Bestäubungen. Längshalbierte Blüten 2/1 natürliche Grösse.

kelten Samen, die unverkennbar geringere Vitalität der Keimlinge und die Schwierigkeit ihrer Aufzucht zu blühenden Pflanzen. Sehr wahrscheinlich spielen auch bei den einseitigen Nachkommen aus interspezifischen Bestäubungen die Korrelationen zwischen Embryo und Endospermibildung und damit der späteren Ernährung des Embryos – wie in Fällen der Pseudogamie – eine entscheidende Rolle.

Durch den Nachweis ihrer Entstehung und die Analyse von Phäno- und Genotypus der «maternal hybrids» in einigen Gattungen der Blütenpflanzen wird unsere Kenntnis der in der Fortpflanzungssphäre der Blütenpflanzen ausserhalb des «Normalfalles» typischer Amphimixis vorhandenen Möglichkeiten erweitert. *Der Entstehung muttergleicher Nachkommen nach Kreuzungen an und mit autonom-apomiktischen, wie von Arten mit induziert-apomiktischer Samenbildung, schliessen sich, mit allerdings weitaus bescheideneren Nachkommenschaftsraten im Einzelfall, die Erscheinungen der Haplo- und insbesondere der Diplo-Parthenogenesis zwanglos an.*

Die im vorstehenden besprochenen Studien zum Problem muttergleicher Nachkommen nach interspezifischen Bestäubungen bringen eine Erklärung für manche bis anhin gemachte und wohl weitere in Zukunft noch zu machende Feststellungen über Ausnahmen und Abweichungen in den Resultaten von Vererbungsstudien nach intra- wie nach interspezifischen Elternkombinationen. Sie bestätigen wieder die Erkenntnis, dass man sich auch in der Genetik, wie in jeder andern experimentell-biologischen Forschungsrichtung, damit abfinden muss, dass alle unsere Erfahrungen, Vorstellungen und Begriffe vom sogenannten normalen Geschehen nur Abstraktionen und Verallgemeinerungen aus einer mehr oder minder grossen Zahl von Einzelfällen bleiben und in keiner Weise das in Raum und

Zeit unermessliche natürliche Geschehen erklären oder auch nur begreiflich machen.

Summary

A concise survey is given of the possibilities of producing *motherlike* descendants: the so-called "maternal hybrids", after interspecific pollinations in flowering plants.

On the basis of his extensive experiments in pollination and interspecific crossings with species of different sections of the genus *Primula*, the author believes that he has proved that the motherlike descendants from interspecific crossings in *Primula*—as in other genera like *Solanum* and *Digitalis*—are the result neither of amphimictic combination nor of partial aposporic or pseudogamic reproduction. They are rather the result of parthenogenetic embryo formation in developing seeds, the smaller part perhaps of haplo-, the greater and more conspicuous part of diplo-parthenogenesis.

With these unexpected additions, the possibilities of the origin of motherlike descendants from interspecific crossings now include:

(1) Mother (or Father-) like descendants from *normal amphimictic reproduction* after crossings of two species from which the one transfers the dominant, the other the recessive alternatives of the distinguishing morphological and physiological characters.

(2) Motherlike descendants of *non-amphimictic origin* after interspecific pollination on and with *obligate or partial aposporic and pseudogamic species*.

(3) Motherlike descendants of *non-amphimictic origin* from interspecific crossings of normal sexual species, *from seeds with embryos from haplo- or diplo-parthenogenetic development*.

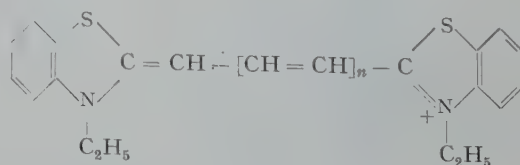
With the description of this third category of formation of motherlike descendants, the circle of possibilities seems to be closed. One may now presume that all facts or "maternal hybrids" cited—except those from crossings with definitely proved "experimental errors"—can be explained by one of the possibilities cited above.

Brèves communications - Kurze Mitteilungen Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

On Stereoisomerism in the Cyanine Dye Series

In the course of his highly interesting studies on the quantitative interpretation of the light absorption of organic dyes, based on an electron gas model, KUHN¹ has presented a theoretical discussion of the spectral bands of symmetrical cyanine dyes corresponding to the general formula²:

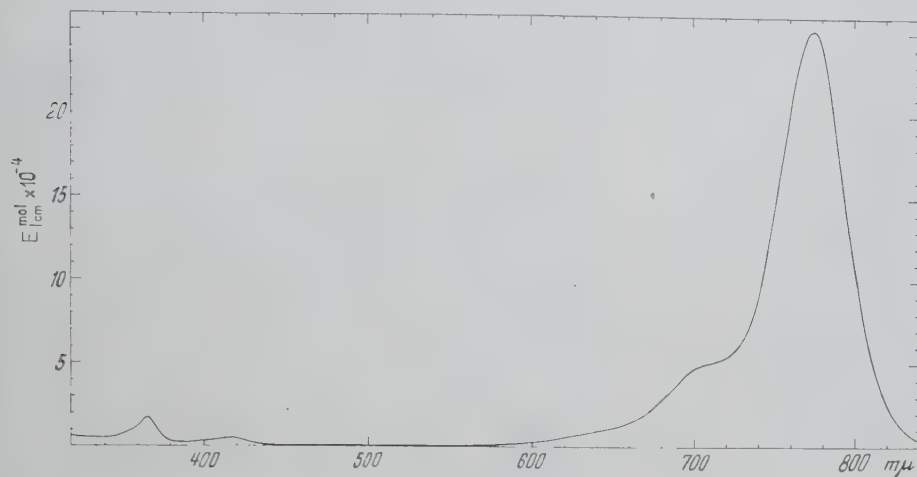


When the pertinent calculated f -values were compared with the available experimental data, some discrepancies obtained which were explained by KUHN as follows: «Immerhin zeigt sich, dass die experimentell erhaltenen

¹ H. KUHN, *Helv. chim. Acta* 34, 1308 (1951).

² Cf. L. G. S. BROOKER, R. H. SPRAGUE, C. P. SMYTH, and G. L. LEWIS, *J. Amer. chem. Soc.* 62, 1116 (1940).

Werte etwas kleiner sind als die theoretisch gewonnenen Beträge. Dieser Befund dürfte... zum Teil damit im Zusammenhang stehen, dass nicht alle Polymethinketten der einzelnen Farbstoffmolekeln in Trans-Konstellation angeordnet sind, dass vielmehr ein Gemisch verschiedener cis-trans-isomerer Verbindungen vorliegt, ähnlich wie dies nach ZECHMEISTER u. a. im Falle der Polyene anzunehmen ist.»



Molecular extinction curve of the $n = 3$ representative of the symmetrical cyanine dye series (in ethylene chloride).

Considering the theoretical importance of the point made by KUHN, we wish to report briefly on some unpublished experiments concerning stereoisomerism of the $n = 3$ member of the above series.

First, according to FISHER and HAMER¹, the quaternary iodide was prepared which did not reveal more than a single zone on the chromatographic column. The iodide was converted into the corresponding chloride simply by a short heating of its ethylene dichloride solution. This solution was purified by chromatographing on calcium carbonate and the upper main zone was cut out. Upon elution with a mixture of ethylene chloride and methanol, the latter was eliminated by washing with concentrated saline solution. The ethylene chloride was then evaporated *in vacuo*, the cyanine chloride taken up in some methylene chloride and crystallized by the addition of hexane (rectangular prisms).

When a fresh ethylene chloride solution of these crystals was adsorbed on calcium carbonate and developed with ethylene chloride containing 10 per cent acetone, three sharply differentiated dark blue zones appeared although no marked interzones were observed. The uppermost zone, very probably containing the all-trans form, showed the darkest shade. When any of the three zones was cut out, eluted as described above, transferred into ethylene chloride and rechromatographed, exactly identical chromatograms, composed of the three zones obtained. The colorimetrically measured ratio of the three pigment forms was practically constant, viz. 82:13:5 (from top to bottom).

The spontaneous interconversion of the stereoisomers at room temperature, during elution and transfer operations, took place at such high rates that refluxing, exposure to sunshine, etc., did not essentially alter the ratio mentioned. Neither was it possible, for the same reason, to differentiate in the BECKMAN spectropho-

meter between eluates of the respective pigment zones. Thus, in numerous experiments, the same spectral curve was obtained from any form (Fig.)¹.

In accordance with KUHN's concept, we believe that solutions of at least the member studied in the cyanine dye series contain a stereoisomeric equilibrium mixture, in which, evidently, not all possible cis-trans forms are present in equal quantities but a few configurations

predominate as had been observed earlier in the field of diphenylpolyenes and carotenoids².

L. ZECHMEISTER and J. H. PINCKARD

California Institute of Technology, Gates and Crellin Laboratories of Chemistry, Pasadena, California, No. 1744, October 15, 1952.

Zusammenfassung

Chromatographische Beobachtungen stützen die auf spektraltheoretische Berechnungen basierte Annahme von H. KUHN, dass in gewissen Zyaninfarbstofflösungen ein Gemisch von cis-trans-isomeren Formen vorliegt.

¹ For a curve of the iodide in methanol, taken between wave lengths, 540–820 mμ cf. L. G. S. BROOKER, R. H. SPRAGUE, C. P. SMYTH, and G. L. LEWIS, *J. Amer. Chem. Soc.* **62**, 1116 (1940); cf. also A. L. SKLAR, *J. chem. Phys.* **10**, 521 (1942).

² L. ZECHMEISTER, *Chem. Reviews* **34**, 267 (1944).

Phospholipid-Cholesterol Complex in the Structure of Myelin

When the principal long spacings in the X-ray diffraction pattern of fresh normal nerve are compared with those of specimens which have been modified either by previous drying and re-wetting with RINGER solution¹, or by freezing and thawing², or by treatment with lipid solvents³, it is seen that the modifications of structure apparently lead to increases in diffraction spacings. Similarly, when "residual complex" spacings of normal dried

¹ J. ELKES and J. B. FINEAN, *Discussions of The Faraday Society*, No. 6 (Lipoproteins), p. 134 (1949).

² J. ELKES and J. B. FINEAN, *Exp. Cell Res.* (in press).

¹ N. I. FISHER and F. M. HAMER, *J. chem. Soc. (London)* **1933**, 189.

nerve are compared with those of nerve which have been modified before drying, it is again found that the modified specimens show the higher diffraction spacings.

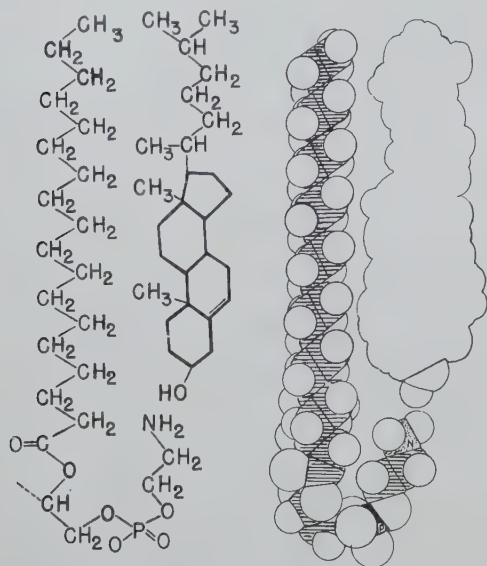


Fig. 1.

A detailed study of these diffraction patterns indicates that the most probable structure for myelin is one consisting of alternate layers of lipid and a non-lipid material which may be protein. The fundamental repeating unit of the structure probably contains two bimolecular leaflets of lipid which must be very similar in constitution but differ in geometrical arrangement, and two layers of protein, the whole system building up to a spacing of about 171 Å. In the lipid layer, the longest lipid molecules appear to be tilted or curled in some way so that they do not contribute their fully extended length to the thickness of the leaflet. The curled form would appear to be more in keeping with the radial orientation data derived from polarised light¹ and X-ray diffraction studies², and some way of stabilizing these long molecules individually in a curled form would seem to be necessary. A consideration of the molecular structures of individual lipid components of myelin indicates the possibility of a stable complex formation between cholesterol molecules and the longer phospholipid or cerebroside molecules. Cholesterol is present in myelin in approximately equimolecular proportions with phospholipid, and furthermore it is found only as free cholesterol, a fact which suggests that the -OH group may be important in binding the molecule into the myelin structure. A possible arrangement for the complex is illustrated in Figure 1. Here, each long-chain lipid molecule is stabilized individually by a cholesterol molecule. The hydrocarbon part of the cholesterol lies alongside the long chain of the phospholipid or cerebroside, and adheres by VAN DER WAAL'S attractive forces. The polar end group of the long chain lipid curls around so as to come into close association with the -OH group of

the cholesterol. In the case of a phospholipid molecule such as phosphatidyl ethanolamine (used in the illustration) or phosphatidyl serine, which has a terminal amino group, there is the possibility of hydrogen bond formation, but in the case of other molecules simply a general ionic interaction is postulated. Such a complex, in which the longest and shortest lipid molecules in myelin are bound together to form a single stable unit, is suggested as a possible component of myelin. The highest bimolecular leaflet spacings obtained in the fractionation of nerve lipids are of the order of 65 Å. If a lipid giving such a spacing is associated with cholesterol (bimolecular leaflet about 35 Å) in the manner indicated, then the layer thickness would be effectively reduced to about 50 Å. The X-ray diffraction data from modified nerve structures indicates that the protein layers may be about 30 Å thick. If the protein layers of fresh myelin have a thickness of this order, and the lipid layers are about 50 Å, then the water layers may contribute as little as 10 Å to the repeating unit of 170 Å. Such a structural unit for myelin, incorporating the cholesterol-phospholipid (or cerebroside) complex and these proposed layer thicknesses, is illustrated in Figure 2. The necessary difference in geometrical arrangement between the two lipid layers shown here is such that one is a mirror image of the other about the plane of the protein layer. This would appear to be one of the simplest ways of representing the difference between the lipid layers, but it would place certain limitations on the free rotation of the lipid molecules and complexes about their long axes.

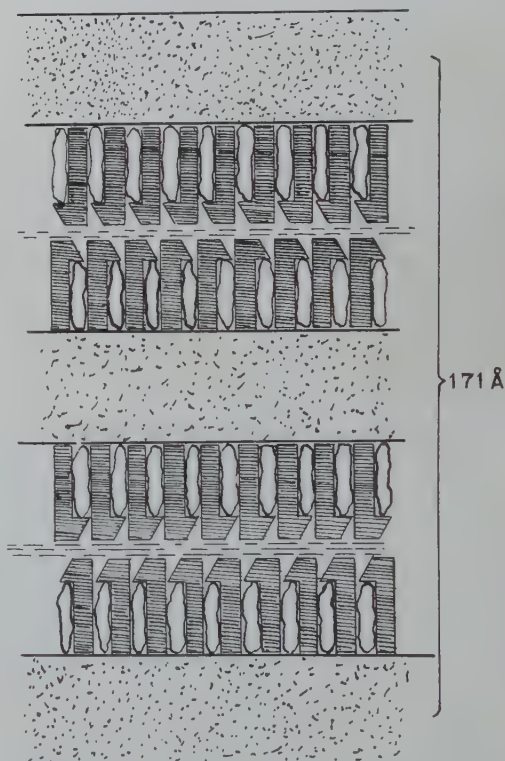


Fig. 2.

A more detailed discussion of this structure and the extent to which it helps to explain X-ray diffraction data on the modification of myelin will be published soon.

¹ W. J. Z. SCHMIDT, *Zellf. mik. Anat.* 23, 657 (1936).

² J. ELKES and J. B. FINEAN, *Discussions of The Faraday Society* No. 6 (Lipoproteins), p. 134 (1949). - F. O. SCHMITT, R. S. BEAR, and K. J. PALMER, *J. Cell Comp. Physiol.* 17, 353 (1941). - G. BOEHM, *Koll. Z.* 62, 22 (1933).

I am grateful to Professor A. C. FRAZER and Professor J. ELKES for their continued interest in this work and to the Medical Research Council for financial assistance.

J. B. FINEAN

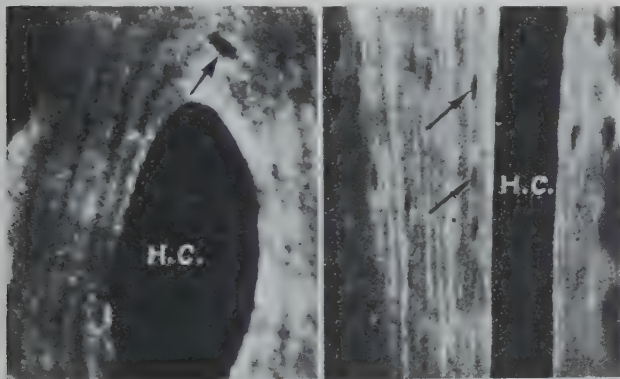
Department of Pharmacology, The Medical School, Birmingham 15, September 12, 1952.

Zusammenfassung

Auf Grund von Untersuchungen mit Röntgen-Kleinwinkelstreuung an myelinhaltigen Nervenfasern wird ein erweitertes und verfeinertes Molekül-Modell beschrieben.

Lamellar Structure of Osteons Demonstrated by Microradiography

Microradiography with soft X-rays has been used to demonstrate the content of mineral salts in the different structures of bone¹. It has been possible to prove that the osteons have a varying content of mineral salts and that within an osteon the mineralization has its highest value close to the HAVERSIAN canal and diminishes towards the periphery. In general the young osteons formed in the resorption cavities have a much lower content of mineral salts than the old osteons (fragments of old bone). There is a continuous increase of the amount of mineral salts in the osteon with its increasing age².



In a series of investigations dealing with electron microscopy of bone³ the lamellae of the osteons have been demonstrated at high magnification. Based on electron microscopic investigations of replicas of bone tissue the conclusion was drawn that the osteons are built up of alternating "fibrillar" and "cemented" lamellae⁴.

From the above it is evident that it would be of great interest if microradiographs could be registered with such high resolving power that the mineral content of the lamellae could be demonstrated by X-ray absorption.

¹ R. AMPRINO and A. ENGSTRÖM, *Acta Anat.* 15, 1 (1952). – A. ENGSTRÖM and R. AMPRINO, *Exper.* 6, 267 (1950). – R. AMPRINO, *Z. Zellforsch.* 37, 144 (1952).

² R. AMPRINO and A. ENGSTRÖM, *Acta Anat.* 15, 1 (1952).

³ CH. ROUILLER, L. HUBER, ED. KELLENBERGER, and E. RUTISHAUSER, *Acta Anat.* 14, 9 (1952). – L. HUBER and CH. ROUILLER, *Exper.* 7, 338 (1951). – E. RUTISHAUSER, L. HUBER, E. KELLENBERGER, G. MAJNO, and CH. ROUILLER, *Arch. Sci. (Soc. Phys. Hist. nat. Genève)* 3, 175 (1950).

⁴ CH. ROUILLER, L. HUBER, ED. KELLENBERGER, and E. RUTISHAUSER, *Acta Anat.* 14, 9 (1952).

Cross and longitudinal sections 5 to 10 μ in thickness were prepared from human femur (compacta). The sections were ground on glass plates under absolute ethanol¹. These sections were placed in close contact with a fine grained LIPPMAN photographic emulsion and exposed with 4 kV X-rays in vacuo. The X-rays were filtered in 9 μ of aluminium. Thus an 1:1 scale image of bone section was produced by the X-rays on the LIPPMAN emulsion. This image was enlarged by photomicrography. In the figure there are shown two such enlarged microradiographs registered from cross and longitudinal sections. The whiter a structure is in the figure the higher its content of mineral salts. The arrows point to osteocytes. The osteocytes are not mineralized. H.C. indicates the HAVERSIAN canal. *From the pictures it is evident that the X-ray absorption varies in the different lamellae.* In agreement with earlier investigations² we again find a higher mineralization in the part of the osteon that is closest to the vascular channel, and that the young osteons are less mineralized than the old parts of the bone. At the wavelengths used, the major X-ray absorption is caused by both the organic and inorganic components of the bone tissue. The greatest part of the radiation generated at 4 kV and filtered in 9 μ Al lies at wavelengths between 8 and 12 Å with a small portion with wavelengths about 3 Å³. The former wavelength range lies beyond the K-absorption edges of calcium and phosphorus, which somewhat reduces the inorganic contributions to the absorption. For X-rays of 8-32 Å wavelength the mass absorption coefficients for protein and tricalciumphosphate are 1000 and 1400 (to the nearest hundred). A 5 μ thick section of protein transmits about 60% of 8-32 Å X-rays while a 5 μ thick layer of tricalciumphosphate transmits about 12%. Some complementary experiments were performed with 3 Å X-rays and the lamellar structure could be seen also with this radiation although not so clear as with the 8-12 Å X-rays. At 3 Å the mass absorption coefficient for calcium is about 1000 but for protein only about 50. In this wavelength (3 Å), therefore, practically all absorption is caused by the mineral salts.

From the experiments and consideration presented above it is clear that the X-ray absorption varies in different lamellae. *Thus there are lamellae with a high content of substances (organic + inorganic material) alternating with those having less substance.* The ratio inorganic to organic material is probably higher in the lamellae with a high X-ray absorption than in those with less absorption. The latter conclusion is in agreement with electron microscopic observations⁴.

A. ENGSTRÖM and B. ENGFELDT

Institutionen för fysikalisk cellforskning, Karolinska Institutet, Stockholm, October 24, 1952.

Zusammenfassung

Die Lamellen des Haverschen Systems wurden durch Röntgenmikroradiographie demonstriert. Lamellen mit hoher Röntgenabsorption wechseln mit solchen niedriger Absorption ab.

¹ R. AMPRINO, *Z. Zellforsch.* 37, 144 (1952).

² R. AMPRINO and A. ENGSTRÖM, *Acta Anat.* 15, 1 (1952). – A. ENGSTRÖM and R. AMPRINO, *Exper.* 6, 267 (1950). – R. AMPRINO, *Z. Zellforsch.* 37, 144 (1952).

³ A. ENGSTRÖM and B. LINDSTRÖM, *Biochim. biophys. Acta* 4, 351 (1950).

⁴ CH. ROUILLER, L. HUBER, ED. KELLENBERGER, and E. RUTISHAUSER, *Acta Anat.* 14, 9 (1952).

The Selectivity of the Gram-stain for Keratins

The keratin structure of wool or hair is well known to be present in skin epithelium, feathers, myosin, actin, fibrinogen, nails, horn, haemoglobin, vitelline and shell membrane of the egg as well as in dental enamel. Recently it was shown that bacterial membranes¹ and the membrane sheath of spermatozoa² also behave like wool-keratin.

In spite of such a wide variety of distribution, no specific or selective staining method seems to have been found for keratins. Neither MASSON's trichrome stain in MALLORY's adaptation as recommended by CONN³ for the "staining of keratin", nor the Gram-stain of ERNST⁴ claimed as "nicht restlos spezifisch" by ROULET⁵ apparently fulfill the desired criteria.

Since some of the previous work of the author was concerned with the mechanism of Gram-stain reversal⁶ of keratins present in wool or in bacteria, it was decided to investigate the selectivity and limitations of the Gram-stain, especially in histological specimens containing keratins.

In studying the keratin parts of normal and malignant epithelial sections, the results confirmed the very old and seemingly forgotten observations of ERNST⁴, who detected the selective action of the Gram-stain for certain keratins. However ERNST in his time could not understand why the "fertige Haarschaft", that is the fully developed or keratinized hair did not take the dye when stained according to GRAM. He was not aware of the change that takes place in the composition of the hair-keratin as it is formed in the follicle. We now know that most of the sulphur in the hair itself is in the form of cystine (containing -S-S- bridges) whereas in the intra-follicular part of the hair the sulphur is largely in the form of SH-groupings. Thus fully keratinized hair, nails, etc. stain Gram-negatively, whereas similar structures, but only partially developed, e.g. hair in the process of growth in the follicle, stain Gram-positively; the SH-groups present in this preformative eukeratin-stage are similar to those present in fully developed α -keratins which had been treated (degraded) with alkali or reducing agents¹. We conclude therefore that the presence of SH- and other reducing groups in the keratins of wool, hair, or nails is associated with the Gram-positive staining behavior.

The Gram-negativeness of intact wool⁷ or that of Gram-negative bacteria⁸ could be reversed to a Gram-positive staining behavior by treating them with alkalis or reducing agents. Alkali-degraded wool or Gram-positive bacteria on the other hand can be made to behave Gram-negatively if treated with acids or oxidizing agents prior the Gram-staining procedure⁹. Contrary to the results with wools, conversion experiments with keratin derived from either benign or malignant strati-

fied squamous epithelium did not alter the Gram-positiveness of the keratin. The experiment was attempted by treating the keratin for 5 to 10 h with a neutralized or even slightly alkaline 1% solution of sodium metabisulphite. In normal skin the stratum corneum of the surface epithelium is strongly Gram-positive and the keratohyalin granules of the stratum granulosum are slightly so. It again proved impossible to reverse this staining behavior by treating such material with 0.5% aqueous picric acid solution for 24 h at room temperature. These results are summarized and tabulated with some other characteristic features of keratins¹ in the Table.

As may be seen in the Table, the hard keratins which are present in wool, etc. are characterized by a reversibility of their Gram-staining behavior, whereas the soft keratins which are present in the epidermis (and in nervous tissue) are characterized by irreversibility of this behavior. This fundamental difference is correlated with a difference in chemical composition as indicated in the Table.

The only other commonly occurring protein which might show reversibility of Gram-staining behavior similar to that of the hard keratins is insulin. It also has a high cystine content (12.5%)².

The sulphur content (designated as A-type) of the soft keratins is low, whereas that of the hard keratins is high (A + B-type), and at first sight the difference in reversibility of the Gram-staining behavior might be thought to be correlated with this difference in sulphur content. However intact wool when degraded and thereby renders Gram-positive, loses considerable amounts of its A-type sulphur³ but in spite of this loss can again be rendered Gram negative according to the scheme mentioned above⁴. Thus it is apparent that the reversibility or non-reversibility of Gram-staining behavior in the keratins is dependent not so much on the quantity of sulphur present as upon the presence of a different sulphur fraction. This B-type sulphur fraction, mainly cystine bound differently⁵ gives rise to reducing acidic groups and might be involved also in increased basophilia if the wool is exposed to mild alkaline agents⁶. The B-sulphur fraction is not present in epidermal keratin, a fact which is revealed by irreversibility of its Gram-positiveness. The sulphur in epidermal keratin might be present in fairly stable linkages, probably similar to those present in "overdegraded" wools, which are deprived of their B-type of sulphur and thus can no longer be reversed to a Gram-negative behavior. The stable type of linkage to which we refer is -C-S-C- or methionine type of binding.

Although we have advanced a hypothesis on the mechanism of Gram-stain reversal⁷, we hardly know all the

¹ R. FISCHER and P. LAROSE, Can. J. Med. Sci. 30, 86 (1952).

² R. FISCHER, to be published.

³ H. J. CONN and M. A. DARROW, *Staining Procedures*, Biol. Stain Commission, Biotech. Publ., Geneva, N. Y. Febr. 1952; leaflet IB₃ 18-19.

⁴ P. ERNST, Arch. mikroskop. Anat. 47, 669 (1896).

⁵ F. ROULET, *Methoden der pathologischen Histologie* (Springer, Wien, 1948), p. 480.

⁶ R. FISCHER and P. LAROSE, Can. J. Med. Sci. 30, 86 (1952); J. Bact. 64, 435 (1952). - P. LAROSE and R. FISCHER, Research 5, 419 (1952); Schw. Z. Path. Bakt. (in press).

⁷ R. FISCHER and P. LAROSE, Can. J. Med. Sci. 30, 86 (1952).

⁸ R. FISCHER and P. LAROSE, J. Bact. 64, 435 (1952).

⁹ R. FISCHER and P. LAROSE, Can. J. Med. Sci. 30, 86 (1952); J. Bact. 64, 435 (1952). - P. LAROSE and R. FISCHER, Research 5, 419 (1952); Schw. Z. Allg. Path. Bakt. (in press).

¹ P. ERNST, Arch. mikroskop. Anat. 47, 669 (1896). - K. M. RUDALL, Adv. Prot. Chem. 7, 253 (1952). - W. MONTAGNA, Internat. Rev. Cytol. 1, 265 (1952). - R. J. BLOCK, J. Soc. Cosmet. Chem. 2, 235 (1951). - A. GIROUD and C. P. LEBLOND, Ann. N. Y. Acad. Sci. 53, 613 (1951). - L. SZODORAY, Acta Morphol. Acad. Sci. Hung. 1, 95 (1951). - H. MESCON and P. FLESCHE, J. Invest. Dermatol. 18, 261 (1952).

² E. J. COHN and J. T. EDSALL, *Proteins, Amino acids and Peptides* (Reinhold, New York, 1943), p. 358.

³ R. FISCHER, A. HOELLE, and S. SEIDENBERG, Helv. chim. Acta 34, 210 (1951).

⁴ R. FISCHER and P. LAROSE, Can. J. Med. Sci. 30, 86 (1952).

⁵ F. F. ELSWORTH and H. PHILLIPS, Biochem. J. 32, 837 (1938); 35, 135 (1941). - G. J. SCHURINGA, C. SCHOONEVELDT, and T. KONINGS, Text. Res. J. 21, 281 (1951).

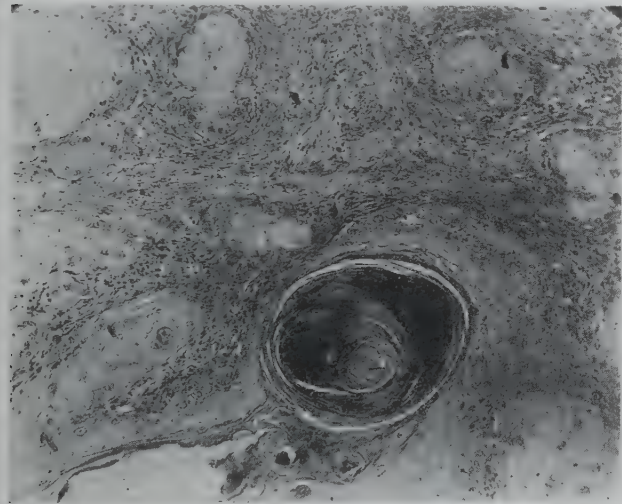
⁶ R. FISCHER and P. LAROSE, Can. J. Med. Sci. 30, 86 (1952); J. Bact. 64, 435 (1952).

⁷ W. MONTAGNA, Internat. Rev. Cytol. 1, 265 (1952).

Some characteristic features of keratins

		α-pattern	Baso- philia	Gram- staining response	Gram-staining behavior ac- cording to red- ox.-scheme	SH- and other reducing groups	Remarks
Hard keratins (euker- atins) e.g. wool, hair, nails	Just formed	Quite stable in boil- ing water	—	—	Reversible	—	Circa has 12·5% of cystine
	Degraded	Still stable even af- ter 22 h of degrada- tion with 0·15 N so- dium carbonate at 80°C	+++	+++	Reversible up to the 4 h degrada- tion step	++	Circa 50% loss of cystine after 4 h of degradation
Soft (or pseudo-) kera- tins e.g. in epidermal and nervous tissue	Strat. germinat.	Unstable in hot wa- ter; changes to the β-pattern at 65°C in the SH-zone, or at 85°C in the S-S-layer respective- ly.	++	—	Irreversible	+++	Lower content of cystine and arginine and higher content of methionine as wool, hair and nails
	Strat. spinosum		++	—		++	
	Strat. granulosum (keratohyalin)		+++	+		++	
	Strat. lucidum		—	++		++	
	Strat. corneum		—	+++		—	

factors governing the Gram-staining response of proteins generally. There seems to be a concordance between the increasing intensity of Gram-positiveness (without counterstain) of wool, egg albumin, caseine, and epidermal keratin on the one hand and their increasing total amount of tyrosine histidine, arginine and lysine on the other.



Keratinizing squamous cell carcinoma of skin; Gram-stained without counterstain.

The selective and irreversible Gram-positiveness of keratinous structures in the epithelium is a constant feature and even in malignant tumors of stratified squamous epithelium in which the stratification is disorganized, keratin, wherever it occurs, stains Gram-positively (Figure). The Gram-staining (25 min with 30 s of “mordanting” with 1% of an alcoholic [80%] iodine) with no counterstain¹ reveals a characteristic keratin pearl which stains Gram-positively. When counterstain is used, e.g. a 0·5% solution of Bismarckbrown, the preceding Gentian violet treatment can be limited to 7 min without

altering the subsequent treatment with the “mordant”. If the 25 min Gram-staining without counterstain is used as in the Figure, other acidic structures such as nuclei also take the Gram-stain but can be prevented from doing so by treatment with nucleases prior to the Gram-staining procedure¹; such a pretreatment does not affect the selectivity of the Gram-stain² for keratinous structures.

We believe that there might be many other possible uses of the described selectivity of the Gram-stain, and especially of the selective Gram-positiveness of soft keratins; e.g. to identify structures which may be keratinous, to stain the horny cells of the vaginal epithelium or for other diagnostic procedures, e.g. in the detection of bronchial carcinoma revealed through the presence of keratinous cell residues in the sputum or bronchial washing fluid, etc.

This work was partly supported by a grant from the Cancer Institute of Canada. The author is greatly indebted to Dr. M. MCKENZIE, Reddy Memorial Hospital, Westmount, for his helpful interest and encouragement. The valuable discussions and suggestions of Dr. P. LAROSE, National Research Council, Ottawa, are also gratefully acknowledged.

R. FISCHER³

Department of Pathology, Reddy Memorial Hospital,
Westmount-Montreal 6, Canada, October 20, 1952.

Zusammenfassung

Die Selektivität der Gram-Färbung für bestimmte Keratine wird postuliert. Das Gram-negative Verhalten harter Keratine (zum Beispiel Wolle) kann durch alkalische und reduzierende Behandlung zum Gram-positiven färberischen Verhalten konvertiert werden; saure und oxydierende Agentien können die so erzielte Konversion wiederum rückgängig machen. Das Gram-positive färberische Verhalten weicher Keratine hingegen (zum Beispiel des Epitheliums) ist unter den Bedingungen des obigen Konversionsschemas irreversibel.

¹ R. FISCHER and P. LAROSE, J. Bact. 64, 435 (1952).
² J. W. BARTHOLOMEW and T. MITTWER, Bact. Rev. 16, 1 (1952).
³ Present address: Regina General Hospital, Munroe-Wing, Research Laboratory, Regina, Sask., Canada.

¹ R. FISCHER, to be published.

Die Röntgenschädigung von *Escherichia coli* bei 180 keV und 31 MeV

Im Rahmen von vergleichenden Untersuchungen über die biologischen Wirkungen von 31-MeV-Röntgenstrahlen einerseits (Betatronanlage der radiotherapeutischen Klinik Zürich) und 180-keV-Röntgenstrahlen andererseits (Stabilivolt, 180 kV, 6 mA, 1 mm Cu) nahmen wir die Schädigungskurven von *Escherichia coli* auf.

Als Versuchsobjekt wählten wir den Stamm 1064 von *E. coli* aus dem staatlichen Seruminstitut Kopenhagen. Die Keime wurden in einem Aerosolapparat vernebelt und auf Agaroberflächen ausgesät. An Stelle von Petrischalen verwendeten wir kleine Plexiglasgefässe; von den 5 gleichzeitig besäten Schälchen dienten 2–4 als Kontrollen. Die Bestrahlung erfolgte im Innern eines Plexiglasphantoms¹; die Agaroberfläche mit den einzeln liegenden Keimen befand sich bei der Bestrahlung mit 31 MeV in einer Tiefe von 42 mm innerhalb des Phantoms, bei 180 keV in einer Tiefe von 13 mm. Zur Dosismessung verwendeten wir eine in das Phantom hineinragende Messkammer des Victoreen-Condenser-R-Meters². Die Intensität betrug bei 180 keV 72,3 r/min, bei 31 MeV durchschnittlich 82 r/min. Nach der Bestrahlung wurden die Keime 14 h lang bei 37°C bebrütet; aus den teilungsfähigen Keimen entstanden dabei makroskopisch sichtbare Kolonien. Die Schalen wurden photographiert und die Kolonienzahlen aus der photographischen Platte ermittelt. Abbildung 1 zeigt als Beispiel das photographische Protokoll des letzten Versuchs.

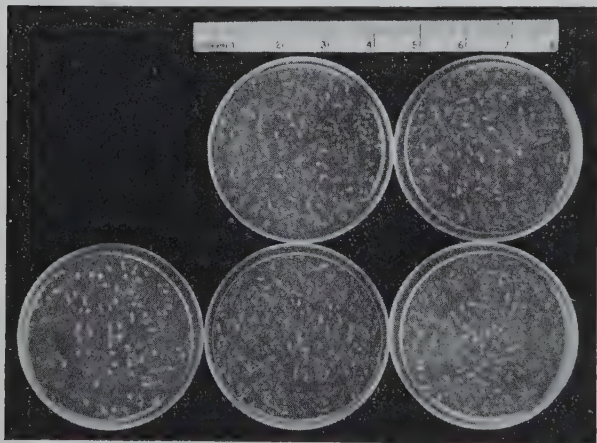


Abb. 1. Versuch vom 18. Juli 1952: Links unten eine Platte, die mit 4338 r bei 180 keV bestrahlt wurde. Die übrigen vier Platten sind Kontrollen.

Die statistische Bearbeitung der Kontrollversuche zeigt, dass eine homogene Aussaat der Keime erreicht wurde. Das Ergebnis der Bestrahlungsversuche ist in Abbildung 2 graphisch dargestellt. Das vorliegende Material gestattet keine Entscheidung darüber, ob exponentielle oder asymmetrische S-förmige Schädigungskurven vorliegen. Es schien uns natürlicher und dem Stand unseres Unwissens über den Mechanismus der Strahlenwirkung angemessener, unsere Daten so zu behandeln, als ob die Schädigungskurven asymmetrische S-Kurven wären; wir haben deshalb die statistische

Auswertung mit Hilfe der Probitanalyse¹ durchgeführt. Die Versuchspunkte in den transformierten Koordinaten, die sich jetzt um Geraden gruppieren, zeigt Abbildung 3. Bei der Berechnung der Gewichte, die den einzelnen Versuchen zukommen, ist die Tatsache zu berücksichtigen, dass die Zahl der bestrahlten Keime nicht bekannt ist, sondern auf Grund einiger weniger Kontrollplatten geschätzt werden muss².

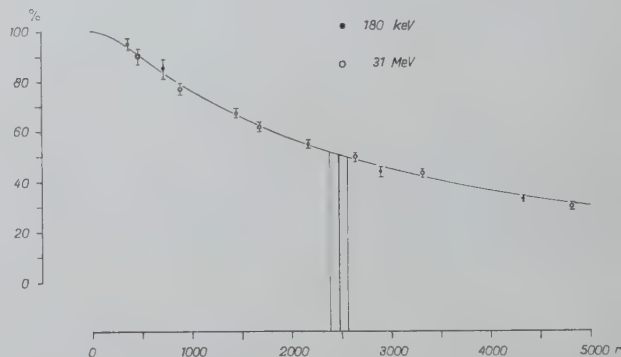


Abb. 2. Die Versuchspunkte in den untransformierten Koordinaten; die Striche geben die Streuung an. Die Kurve ist rücktransformiert aus der Geraden in Abbildung 3.

Nach einem Rechnungszyklus der Probitanalyse erhält man für die 180-keV-Punkte und für die 31-MeV-Punkte je eine Gerade; diese zwei Geraden unterscheiden sich nicht merklich voneinander. Es lässt sich abschätzen, dass ein Unterschied in den DL50 von mindestens 7% mit Sicherheit hätte festgestellt werden können. Fasst man sämtliche Punkte zusammen, so ergibt sich eine DL50 von 2475 r mit Vertrauensgrenzen («fiducial limits 95%») bei 2368 r und 2586 r.

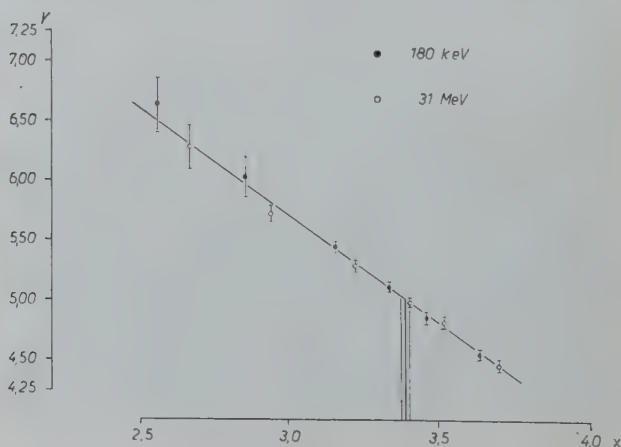


Abb. 3. Die Versuchspunkte in den transformierten Koordinaten (Probitanalyse). Die Gerade bezieht sich auf alle Versuchspunkte.

Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zur Arbeit von DIECKMANN *et al.*³, die eine grössere Wirksamkeit der 2-MeV-Elektronenstrahlung gegenüber 180-keV-Röntgenstrahlen festgestellt haben, sowie zur Arbeit von STAPLETON und ATWOOD⁴, die eine geringere Wirksam-

¹ D. J. FINNEY, *Probit Analysis*, II. Aufl. (Cambridge University Press, 1952).

² F. M. WADLEY, *Ann. Appl. Biol.* 36, 196 (1949).

³ C. DIECKMANN, W. DITTRICH, H. REICH und G. SCHUBERT, *Naturwissenschaften* 37, 140 (1950).

⁴ G. E. STAPLETON und K. C. ATWOOD, *Naturwissenschaften* 39, 330 (1952).

¹ H. FRITZ-NIGGLI, *Naturwissenschaften* 39, 485 (1952).

² G. JOYET und W. MAUDERLI, *BBC.-Mitteilungen* 38, 281 (1951).

keit von 1,1-MeV-Gammastrahlen gegenüber 250-keV-Röntgenstrahlen fanden. Solche Diskrepanzen werden erst ihre Lösung finden, wenn brauchbare Normen für die Dosimetrie der energiereichen Strahlen vorliegen. Die Arbeit erscheint ausführlich an anderer Stelle.

J. LINDENMANN

Hygiene-Institut und radiotherapeutische Klinik der Universität Zürich, den 8. Oktober 1952.

Summary

Survival curves of *Escherichia coli* irradiated with X-rays of 180 KeV and 31 MeV are identical within the experimental error. Probit analysis of the data was performed.

In vitro Development of Streptomycin Resistance in *Bacterium tularens*

The structural and functional changes occurring in microorganisms in the process of developing resistance to chemical agents are well known, but quite unpredictable. Streptomycin-resistant strains of *Bacterium tularens* do not appear to have been described despite the extensive use of streptomycin as the chief therapeutic agent in the treatment of Tularemia. CHAPMAN, DOWNS, CORIELL, and KOWAL¹ tried in vain to isolate resistant strains from mice treated with subcurative doses of streptomycin; they quote, however, unpublished experiments by FOSHAY, who observed induced resistance to streptomycin in *Bacterium tularens* *in vitro*.

This note reports on the *in vitro* production of resistance to streptomycin in *Bacterium tularens* and on certain properties of the resistant strains.

Most of the experiments were carried out with the highly virulent (LD_{50} 10^{-10}) strain Vir. The standard suspension of bacteria from which the dilutions were made for titration in mice, contained 10^{10} organisms per milliliter. Cultures were grown on glucose-cysteine-blood-agar, to which streptomycin was added in various concentrations. At the onset, the strains were susceptible to 1–2 μ g of streptomycin per milliliter of culture media. The microorganisms were cultivated in progressively graded concentrations of streptomycin. The initial development to resistance was very gradual; however, when the level of resistance of 10 μ g/ml was obtained, the strains could be transferred directly to a medium containing 40 mg/ml, the highest concentration tested. Such an abrupt rise to a very high level of resistance has been observed in other microorganisms which developed resistance to streptomycin².

The morphological and physiological changes accompanying the development of streptomycin resistance were investigated on twelve resistant strains developed in parallel from a common parent strain Vir. No microscopical changes or alterations in the main nutritional requirements could be found, the addition of cysteine and blood to the basal medium used still being necessary. Also the rate of growth on this medium did not change with the development of the resistance.

As a good correlation has been described¹ between the biological and the surface properties of the bacterium, agglutinability by N/160 NaCl of the original and of the resistant strains was determined in parallel with the virulence titrations in mice. The results are summarized in the Table.

Virulence and salt agglutinability of *Bact. tularens* strains, resistant to streptomycin

Strains*	Salt agglutinability	Dilution required for LD_{50}
S.M.R. 1 . .	+++	10^{-2}
S.M.R. 2 . .	+++	10^{-6}
S.M.R. 3 . .	+++	10^{-2}
S.M.R. 4 . .	+++	10^{-2}
S.M.R. 5 . .	+++	10^{-1}
S.M.R. 6 . .	+++	without dilution
S.M.R. 7 . .	+++	10^{-1}
S.M.R. 8 . .	+++	completely avirulent
S.M.R. 9 . .	—	10^{-10}
S.M.R.10 . .	+++	without dilution
S.M.R.11 . .	+++	without dilution
S.M.R.12 . .	++	10^{-8}

* All strains were derived from the common parent strain Vir, which was non-agglutinable and had LD_{50} 10^{-10} .
(+++ indicates 5–10% agglutinable bacteria, ++++ complete agglutination.)

Most of the resistant mutants showed a greatly decreased virulence, and a connection between these two properties appears likely. Indeed, when the parent strain was subjected to an equal number of transfers, bnt in the absence of streptomycin, no change in virulence occurred. The good correlation observed between salt agglutination and virulence emphasizes once more the importance of surface properties for the biological activity of bacteria. The Table shows further that in most cases the decrease in virulence and the change in suspension stability were very abrupt. This may indicate that there existed in the strains investigated two types of cells, one of very high, the other of very low virulence, without intermediate stages. In the few cases where the strains showed an intermediate degree of virulence and the salt agglutination was found to be incomplete, one may assume that these strains are actually mixtures of microorganisms of the two extreme types in varying proportions. In the light of these findings, the failure to isolate resistant strains of *Bacterium tularens* from mice treated with sub-curative doses of streptomycin² may be assumed to be due to the fact that the resistant avirulent mutants could not multiply in the body of the mouse, and were eliminated by the defence mechanism of the body, so that their detection became impossible.

A similar correlation between changes in virulence and the development of streptomycin resistance has been observed previously by SELIGMAN and WASSERMAN in the *Salmonella* group³ and by GYSON and CRYST in hemolytic *streptococci*⁴.

¹ S. S. CHAPMAN, C. M. DOWNS, L. L. CORIELL, and S. F. KOWAL, J. Infect. Dis. 85, 25 (1949).
² R. MURRAY, L. KILHAM, C. WILCOX, and M. FINLAND, Proc. Soc. Expt. Biol. Med. 63, 470 (1949). — A. L. OLITZKI, J. Gen. Microbiol. 6, 166 (1952).
³ Y. AVI-DOR and H. YANIV, Unpublished results.
⁴ S. S. CHAPMAN, C. M. DOWNS, L. L. CORIELL, and S. F. KOWAL, J. Infect. Dis. 85, 25 (1949).
⁵ E. SELIGMAN and M. WASSERMAN, J. Immunol. 57, 351 (1947).
⁶ H. M. GEZON and E. E. CRYST, Proc. Soc. Expt. Biol. Med. 68, 653 (1948).

The constancy of the streptomycin resistance in the mutant strain S.M.R.I. was investigated by transferring it to media without streptomycin. Even after 150 transfers, the resistance remained unaltered. Passages through mice were then made to determine the changes of virulence and resistance *in vivo*. After two direct passages from mouse to mouse, using liver and spleen for infection, the strain S.M.R.I. failed to induce the disease and no bacteria could be recovered from the mice. Also with a second technique (isolation and culturing of the strain after each passage, and inoculation of the bacteria from the cultures into mice), no changes either in the resistance or the virulence of the strain could be detected after six passages.

Inoculation of sublethal doses, 0.5 ml of the dilution 10^{-3} , of the S.M.R.I. strain into mice and their subsequent challenge with the virulent strain showed that this quantity of the resistant strain immunized the mice against one million LD_{50} .

Streptomycin resistant and non-resistant strains were tested for their susceptibility to aureomycin and chloramphenicol, the two other most effective antibiotics for *Bacterium tularensis*. No cross-resistance was found in these experiments.

The results presented in this paper show that the acquisition of streptomycin resistance by *Bacterium tularensis* is not accompanied by alterations in nutritional requirements and immunogenic properties, but seems to be connected with a loss of virulence.

H. YANIV, Y. AVI-DOR, and A. L. OLITZKI

Israeli Institute for Biological Research and Department of Bacteriology, Hebrew University – Hadassah Medical School, Jerusalem, September 15, 1952,

Zusammenfassung

Von 12 streptomyzinfesten *B. tularensis*-Stämmen wurden 11 in einer 1/160 normalen NaCl-Lösung agglutiniert und waren von niedrigerer Virulenz als die durch dieselbe NaCl-Lösung nicht agglutinable, hochvirulente Ausgangskultur. Einer dieser streptomyzinfesten, nicht virulenten Stämme war fähig, weisse Mäuse gegen eine Million 50%iger tödlicher Dosen des Ausgangsstammes zu immunisieren.

Die enzymatische Synthese des Glutamins im *Lupinus albus*

Das Vorkommen und die Rolle des Glutamins und Asparagins in Pflanzen bildete seit der Entdeckung dieser Verbindungen den Gegenstand zahlreicher Untersuchungen¹. Die enzymatische Synthese des Glutamins aus Glutaminsäure und Ammoniak wurde aber erst in den letzten Jahren beinahe gleichzeitig von LEUTHARDT und BUYARD² in Meerschweinchen- und Rattenleberhomogenaten und von SPECK³ in Taubenleberhomogenaten nachgewiesen. Sie bewiesen, dass Adenosintriphosphat (ATP) die Energie zur Synthese liefert und dass Magnesiumionen zur Reaktion nötig sind. Ähnliche Ergebnisse erhielten ELLIOTT⁴ und ELLIOTT und GALE⁵

mit Gehirnextrakten bzw. *Staphylococcus aureus*. ELLIOTT berichtet auch kurz darüber, dass im *Lupinus albus* ein Enzym vorkommt¹, welches aus Glutaminsäure und Ammoniak in Gegenwart von ATP und Magnesiumionen Glutamin synthetisiert.

Wir haben versucht, das im *Lupinus albus* nachgewiesene glutaminsynthetisierende Enzym zu isolieren, um seinen Wirkungsmechanismus aufzuklären.

Als Untersuchungsmaterial benützten wir 5–6 Tage lang (bei gewöhnlichem Laboratoriumlicht) keimende *Lupinus-albus*-Samen. Die Samen wurden am 5. bis 6. Tage des Keimens im mechanischen Mörser verrieben und abgepresst. Der Presssaft wurde 24 h lang bei 0°C gegen 0,05 M Phosphatpuffer, pH 6,6, dialysiert. Der dialysierte Extrakt wurde mit dem gleichen Volumen von 0,2 M Azetatpuffer, pH 5,2, versetzt. Der entstehende Niederschlag wurde abzentrifugiert und verworfen. Die überstehende Flüssigkeit wurde bei 0°C mit 0,2 M Essigsäure auf pH 4,2 eingestellt. Der entstehende Niederschlag wurde abzentrifugiert, dann mit 0,2 M Natriumhydrogencarbonat aufgelöst. Die gewonnene Lösung wurde 24 h lang gegen 0,15-M-Natriumchlorid-, 0,005-M-Natriumhydrogencarbonat- und 0,001-M-Kobaltchlorid-Mischung dialysiert, dann wurde das pH mit 0,2 g Essigsäure auf 5,2 gebracht und der gewonnene Niederschlag abzentrifugiert und wieder in 0,2-M-Natriumhydrogencarbonat gelöst. Auf diese Weise reichernten wir das Enzym ungefähr 20fach an.

Die Bestimmung der Aktivität der einzelnen Enzymversuche geschah folgenderweise: die komplette Reaktionsmischung enthielt 0,08 M Succinatpuffer, pH 6,5, 0,005 M Kobaltchlorid, 0,05 M neutralisiertes Hydroxylaminhydrochlorid, 0,05 M Natriumglutamat und 0,006 M ATP. Gesamtvolumen der Reaktionsmischung 4 ml, Inkubation: 60 min bei 30°C.

In den Experimenten, wo die Amidsynthese geprüft wurde, wurde statt Hydroxylamin Ammoniumchlorid verwendet (150 µg NH_3-N). Nach der Inkubation wurde die Reaktion mit Trichloressigsäure abgestellt. Die Bestimmung der Hydroxamsäure wurde nach LIPMANN und TUTTLE² durchgeführt. Die Glutaminbestimmung wurde mit *Clostridium Welchii* SR 12 Stamm nach KREBS³ durchgeführt.

Tabelle I

Inkubation	Hydroxamsäurebildung in µM	Abgespaltenes anorganisches Phosphat in µM
Komplettes System. . . .	8,0	8,6
Ohne Glutaminsäure . . .	0,0	0,6
Ohne ATP.	0,0	0,0
Ohne Kobaltionen	1,0	1,6
Ohne Hydroxylamin . . .	0,0	0,7

Wie Tabelle I zeigt, wird parallel mit der Hydroxamsäuresynthese aus dem ATP anorganisches Phosphat abgespalten. Das gereinigte Enzym zeigt in Abwesenheit von Kobaltionen fast keine Aktivität. Auf ähnliche Weise aktivieren auch Magnesium und Manganionen. Das Enzym ist streng spezifisch für die 1(+) Konfiguration der Glutaminsäure, es wirkt auf d(–) Glutaminsäure und Asparaginsäure nicht ein. Die Abbildung zeigt die Ionenaktivierung des Enzyms.

¹ H. E. STREET, Adv. Enzymol. 9, 391 (1949).

² F. LEUTHARDT und E. BUYARD, Helv. med. Acta 14, 247 (1947).

³ J. F. SPECK, J. biol. Chem. 168, 403 (1947).

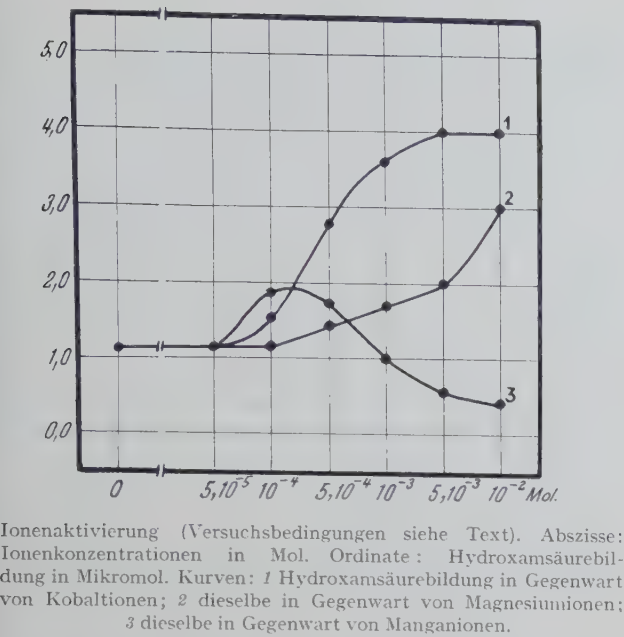
⁴ W. H. ELLIOTT, Nature 161, 128 (1948).

⁵ W. H. ELLIOTT und E. F. GALE, Nature 161, 129 (1948).

¹ W. H. ELLIOTT, Biochem. J. 49, 106 (1951).

² F. LIPMANN und L. C. TUTTLE, J. biol. Chem. 159, 21 (1945).

³ H. A. KREBS, Biochem. J. 43, 51 (1948).



Der nähere Mechanismus der Teilnahme des ATP. in der Glutaminsynthese ist heute noch nicht klar. Es ist aber möglich, dass das Enzym eine Reaktion zwischen Glutaminsäure und ATP. katalysiert, wobei Glutaminsäure- γ -Azyolphosphat entsteht. Diese Verbindung reagiert nicht enzymatisch mit Ammoniak oder Hydroxylamin, und es entsteht Glutamin, bzw. Hydroxamsäure, wobei anorganisches Phosphat freigesetzt wird. Dafür spricht die Beobachtung, dass das von uns nach einer unveröffentlichten Methode synthetisierte Glutaminsäure- γ -Azyolphosphat auch in Abwesenheit des Enzyms mit Ammoniak und Hydroxylamin reagiert.

Tabelle II

Inkubation	Hydroxamsäurebildung in Mikromol	Glutaminbildung in Mikromol
25 μ M Glutaminsäure- γ -Azyolphosphat + 50 μ M Hydroxylamin . .	24,2	—
25 μ M Glutaminsäure- γ -Azyolphosphat + 50 μ M Ammoniumchlorid	—	24,4

Unter Freisetzung von anorganischem Phosphat entsteht Glutamin bzw. Glutaminsäure-Hydroxamsäure. In diesem Falle wäre das Enzym, welches die Synthese katalysiert, als eine Phosphopherase zu betrachten. Eine ausführlichere Mitteilung über diese Experimente wird in *Acta Physiologica Hungarica* erscheinen.

G. DÉNES

Medizinisch-Chemisches Institut der Medizinischen Universität, Budapest, den 15. September 1952.

Summary

Purified extracts of germinated *Lupinus albus* seeds catalyse the reaction between A.T.P., glutamate and ammonia or hydroxylamine in the presence of cobalt ions, with the formation of glutamine and hydroxamic

acid, respectively. The preparation and some properties of the enzyme are described. In this system 1 (+) glutamic acid cannot be replaced by d (–) glutamic or aspartic acid. Cobalt ions can be substituted by magnesiumium or mangano ions.

Synthetic γ -glutamyl phosphate reacts non-enzymatically with ammonia or hydroxylamine, whereby glutamine, respectively hydroxamic acid is formed. If the enzyme reaction involves the intermediate formation of γ -glutamyl phosphate – as is generally supposed – it seems most probable that the synthesis of glutamine and hydroxamic acid requires no further enzyme action. Once the γ -phosphate is formed, the mixed anhydride is simply split in the presence of any nitrogeous base. In this case the enzyme catalysing the synthesis of glutamine may be considered to be a phosphopherase.

Fécondation artificielle de *Xenopus laevis* sans sacrifice du géniteur mâle¹

Dans certaines conditions, le crapaud sud-africain *Xenopus laevis* peut toute l'année se reproduire en captivité et il présente de nombreux autres avantages: élevage facile², développement embryonnaire rapide³, les animaux peuvent rapidement atteindre leur maturité sexuelle (6-8 mois)⁴, les œufs sont relativement peu chargés de vitellus et leur gangue muqueuse est peu épaisse.

Toutefois, l'amplexus durant plusieurs heures, les embryons se trouvent à des stades très différents à un temps donné. Quant à la fécondation artificielle des batraciens en général, elle ne se pratique qu'en obtenant le sperme par prélèvement des testicules⁵, c'est un procédé peu économique, et l'élimination d'un des géniteurs met en cause l'éventualité du back-cross. L'obtention d'œufs fécondables de *X. laevis* par injections de gonadotrophines est bien connue⁶. Notre problème essentiel consistait à disposer d'une suspension spermatique où les spermatozoïdes soient en concentration suffisante et doués d'une bonne motilité. Plusieurs endocrinologistes ont montré qu'il était possible d'amener l'émission de spermatozoïdes chez les batraciens par injection de petites quantités d'adrénaline⁷ ou de gonadotrophines⁸. Nous avons pu obtenir des spermatozoïdes répondant aux exigences du problème en opérant de la façon suivante:

1° *Prétraitement.* Les femelles et les mâles étant élevés séparément dans des bassins dont l'eau courante est à la température de 12-15°C, des mâles adultes, à jeun depuis au moins une semaine, reçoivent de la

¹ Note préliminaire.
² O. HARJOLA et S. TOIVONEN, Ann. Chirurg. Gynaec. Fenniae 38, sup. 3, 68 (1949).
³ P. B. WEISZ, Anat. Rec. 93, 161 (1945).
⁴ L. R. ARONSON, Amer. Nat. 78, 131 (1944). – R. GASCHE, Rev. suisse Zool. 50, 262 (1943).
⁵ R. RUGH, Experimental embryology, A manual of techniques and procedures (Burgers Pub. Co., Minneapolis, 1948) 481 pp.
⁶ H. ZWARENSTEIN, N. SAPEIKA et H. A. SHAPIRO, *Xenopus laevis*, a Bibliography (Cape Town 1946). – G. ANDRES, A. BRETSCHER, F. E. LEHMANN et D. ROTH, Exper. 5, 83 (1949).
⁷ LI MIN-HSIN et CHANG HSI-CHUN, Chinese J. Physiol. 17, 201 (1949). – S. L. ROBBINS et F. PARKER JR., Endocrinology 44, 384 (1949).
⁸ A. L. HASKINS et A. I. SHERMAN, Endocrinology 44, 542 (1949). – L. GALLIEN, C. r. Acad. Sci. 226, 1141 (1948). – J. CREZE, C. r. Soc. Biol. 143, 1331 (1949).

gonadotrophine chorale de jument par injections dans les sacs lymphatiques dorsaux (solutions en eau physiologique). Les doses optima sont variables, elles paraissent comprises entre 150 et 400 U.I. (préparations «Pregnyl», Pharmacia, Uppsala); l'administration se fait en une seule fois ou, pour les doses les plus fortes, en deux fois avec un délai de 24 h entre les deux injections. Les animaux sont maintenus alors à 20°C pendant 24 h avant le traitement d'obtention des spermatozoïdes.

On peut remplacer ce prétraitement par une illumination ultra-violet pour des aquariums de surface $S \# 168 \text{ cm}^2$, placer 8 mâles sous environs 15 cm d'eau et irradier de façon continue 48-96 h avec des lampes type Luma Hgu 75 W (λ entre 3300 et 4000 Å avec optimum à 3650 Å); distance moyenne lampe-surface de l'eau: 13 cm, $\theta = 20^\circ\text{C}$. Ces mâles sont susceptibles de produire l'amplesus.

2° Obtention des spermatozoïdes. Dans les sacs lymphatiques dorsaux des animaux prétraités, injecter 0,5 mg d'adrénaline dans un volume de 0,5 cm³ d'eau physiologique et placer les animaux à 15°C sous environ 10 cm d'eau où ils ne tardent pas à se trouver comme anesthésiés, ce qui est favorable pour leur manipulation ultérieure. Après 120 min, introduire une pipette ($\varphi \# 1 \text{ mm}$) à bord mousse dans le rectum des animaux. On obtient ainsi d'emblée 0,3-1,5 cm³ d'une urine opalescente dont la turbidité est presque uniquement due à la concentration spermatique. Il est très important de manipuler les animaux avec grande douceur au moment du prélèvement de cette «urine spermatique» sinon ils sortent de leur engourdissement et rejettent alors souvent de l'urine, ce qui en amène la perte parfois totale.

Les animaux traités sont essuyés avec un linge du venin qu'ils ont pu produire sous l'action de l'adrénaline; on en profite pour les frictionner légèrement, ce qui permet un retour plus rapide à leur état normal qui débute généralement 4 h après l'injection d'adrénaline. On les place alors dans un aquarium pendant 24 h, sans nourriture, à la lumière blanche diffuse ($\theta = 20^\circ\text{C}$) et sous environ 6 cm d'eau de façon à ce qu'ils puissent venir respirer facilement en surface.

D'avril à décembre de tels animaux peuvent encore fournir une urine bien chargée en spermatozoïdes pendant 2-4 jours consécutifs, à raison d'une ponction rectale par jour après injection de 0,5 mg d'adrénaline. Les animaux sont finalement transférés dans un tank d'eau courante d'environ 300 litres de capacité à l'obscurité ($\theta = 12-15^\circ\text{C}$) ils peuvent recevoir alors une nourriture légère (cubes de cœur de bœuf). On peut les réutiliser après 8-10 jours.

Fécondations. Les œufs, obtenus par pression abdominale de femelles traitées par de la gonadotrophine chorale, sont recueillis sur des lames de microscope et étalés avec précaution en couches mono-ovulaires à l'aide de papilles cloacales de la femelle même. On doit rejeter toute ponte souillée par de l'eau ou de l'urine, elle serait en effet impropre à la fécondation par suite du gonflement de la gangue; rejeter également les fins de ponte chargées d'œufs non mûrs.

A l'aide d'une pipette fine (φ de l'embout 0,2 mm) on égoutte alors la préparation spermatique sur les œufs. La densité optique moyenne de l'urine spermatique obtenue par notre technique a été mesurée au photomètre SPEKKER avec le filtre H 508 et une cuve de 2,5 mm: l'extinction est de l'ordre de 0,110. Nous avons trouvé avantageux (voir au sujet des œufs d'oursins¹ et pour les spermatozoïdes d'oursins², de placer dans la suspension spermatique du glycolle jusqu'à une concentra-

tion finale d'environ 0,02-0,03% (solution-mère à 0,1%, pH 8).

L'insémination des œufs d'une lame de 75 × 35 mm exigeant environ 90 s, la lame traitée est immédiatement décantée sur une lame à traiter à laquelle on adjoint des spermatozoïdes provenant du stock *fraîchement récolté* (moins de 30 min de stockage à 20°C, mais, conservés à 3°C pendant 4 h, ils sont encore féconds). Après 10 min de contact à 20°C, les lames placées dans un couvercle de boîte de PETRI sont lavées rapidement soit avec de l'eau provenant d'élevages de larves et filtrée (exempte de Cl⁻) soit simplement avec de l'eau de conduite et immédiatement recouvertes d'eau de l'un ou de l'autre type.

En opérant ainsi, nous avons pu obtenir jusqu'à 100% de fécondations, mais même dans ces cas favorables 70-80% seulement des œufs suivent un clivage normal et donnent des embryons et des larves. On obtient dans la pratique ordinaire 40-60% d'embryons à des stades homogènes ou peu distincts.

Nous adressons nos vifs remerciements au Professeur J. RUNNSTRÖM pour le grand intérêt qu'il a porté à notre travail.

B. RYBAK¹ et T. GUSTAFSON

Institut Wenner-Gren de biologie expérimentale, Université de Stockholm, le 22 juillet 1952.

Summary

The technique of artificial fertilization of *Xenopus laevis*, without sacrifice of the males, consists of treating both the male and the female with mare chorionic gonadotrophin—or in the case of the male by submitting it to a prolonged ultraviolet irradiation—after which the female is able to shed fertilizable eggs by squeezing, and the male can give urine rich in motile spermatozoa after injection of one high dose of epinephrine. The fertilizations are performed on glass slides in presence of glycine; 40–60% of embryonic developments usually succeed.

¹ Adresse actuelle: Laboratoire de Physiologie, Faculté des Sciences, Nancy.

Faster Action of Vitamin K₁ than of Menadione and Synkavit Intravenously Injected into Vitamin K-deficient Chicks

Numerous investigations have demonstrated the superiority of vitamin K₁ over its simpler substitutes in reversing the prolonged prothrombin time caused by ingestion of dicoumarol. Nevertheless, in the usual tests for vitamin K activity, vitamin K₁, Menadione and Synkavit (tetrasodium salt of 2-methyl-1,4-naphtho-hydroquinone diphosphoric acid) are found to be about equally active when calculated on a molecular basis. If, however, the prothrombin time is determined very soon after the substances have been introduced into the blood stream, it is seen that vitamin K₁ acts much faster than the two other compounds, although after a sufficient time they all result in prothrombin times equal to or slightly shorter than that of normal chicks.

The following experiment was carried out by the assay technique of DAM, KRUSE, and SØNDERGAARD¹ with

¹ E. WICKLUND et T. GUSTAFSON, Ark. Zool. [A]42, n° 12 (1949).

² A. TYLER et E. ATKINSON, Science 112, 783 (1950).

¹ H. DAM, I. KRUSE, and E. SØNDERGAARD, Acta Physiol. Scand. 22, 229 (1951).

minor modifications. The prothrombin time was determined six times for each chick at the intervals indicated in the table, counted from the intravenous injection of aqueous colloidal, or crystalloid respectively solutions of the substances. The amounts used were stoichiometrically equivalent to 100 times the limit dose of menadione (0.03 micrograms per gram of body weight) which results in normal prothrombin time after 22 h when given orally in oil solution.

Prothrombin times in seconds at various intervals after the intravenous injection of vitamin K₁, Menadione and Synkavit. Normal value = 25 s.

	0 h	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h	22 h
Vitamin K ₁ . .	223	44	30	27	28	22
Vitamin K ₁ . .	153	39	32	31	30	24
Menadione . .	165	155	59	40	30	22
Menadione . .	251	206	79	43	33	25
Synkavit. . .	154	120	41	31	27	23
Synkavit. . .	170	151	59	39	34	25

A similar difference between vitamin K₁ and the other substances is observed when the comparison is carried out at much lower or higher levels.

Further details of this study will be published elsewhere.

H. DAM and EBBE SØNDERGAARD

Department of Biochemistry and Nutrition, Polytechnic Institute, Copenhagen, November 1st, 1952.

Zusammenfassung

Die Wirkungsgeschwindigkeiten von intravenös injiziertem Vitamin K₁, Methylnaphthochinon und Synkavit in Vitamin-K-frei ernährten Küken wurden verglichen. Es zeigte sich, dass in den ersten Stunden nach der Injektion Vitamin K₁ die Prothrombinzeit viel schneller zum Absinken brachte als die beiden anderen Verbindungen.

Nucleic Acids and Proteins in the Liver of Guinea Pigs dying from Experimental Ascorbic Acid Deficiency

At present it is generally accepted¹ that total pentose-nucleic acid (P.N.A.) of the liver and of many other tissues is readily diminished by protein-deficient diet or starvation, whereas total desoxypentosenucleic acid (D.N.A.) remains unaffected, and that the loss of P.N.A. is paralleled by that of proteins as well as phospholipids. Studying the relation between the P.N.A. content and the basophilic pattern of mammalian livers, we had an occasion of examining scorbutic guinea pig livers which showed a marked diminution of total protein content without any sign of concomitant loss of P.N.A.

Guinea pigs weighing about 300 g were fed on ascorbic acid-deficient diet by removing green grass and

vegetables from stock diet. In some four weeks the animals became typically scorbutic and began to die. During this period they did not grow but lost body weight gradually, while control animals on normal diet gained much body weight. After the appearance of scorbutic symptoms animals ate little, and their body weight decreased rapidly. It might seem as if the animals died from starvation during the last few days; but this can not have been the case, as shown below. Livers of three dying animals, two of which (II and III in the Table) showed a typical picture of premortal enlargement of mitochondria¹, were subjected to determination of nucleic acids and proteins by SCHNEIDER procedure². As many guinea pigs on normal diet weighing about 300 g (equal to the initial body weight of experimental animals) served as the control. Livers of individual animals were perfused with ice-cold saline and analyzed separately. Orcinol and diphenylamine tests and digestion with H₂SO₄–H₂O₂ followed by hypobromite-iodometry were employed for the determination of P.N.A.-P, D.N.A.-P., and protein-N, respectively³. The D.N.A. content of the average liver nuclei was also determined as reported elsewhere⁴, and the total number of liver nuclei was calculated from D.N.A. contents of the nuclei and the whole tissue.

The results are summarized in accompanying Table. For comparison, our own data on rats dying from prolonged starvation⁵ are also listed. Total D.N.A. and D.N.A. per nucleus of the liver, and hence the number of liver nuclei showed no change from the normal values in both the scorbutic guinea pigs and the fasted rats, suggesting that no necrotic degeneration of liver cells had occurred before the final death. This adds a new example to the concept of the stability of D.N.A. in the liver of adult animals⁶. Now, total P.N.A. of the scorbutic guinea pigs remained constant, whereas that in the fasted rats decreased down to about one third of the control, although the loss of the body weight was nearly comparable in both cases. The striking stability of P.N.A. in the scorbutic liver might be partially reflected by less pronounced decrease of liver weight in these animals than in fasted rats, but this may rather be due to other constituents such as glycogen and lipids. Protein-N of scorbutic animals, however, does show a loss comparable in order with the body weight, but to a lesser extent than in fasted animals. As the number of nuclei in the scorbutic liver is the same as that of the control, the above findings concerning P.N.A. and proteins hold in cell unit also.

The link between the protein and P.N.A. contents of the liver tissue is noted by several workers⁷. As shown in the table, in prolonged starvation the decrease of P.N.A. was, indeed, even more extensive than that of proteins. Therefore, it is rather surprising that the ascorbic acid deficiency resulting in a marked loss of liver protein does not affect the liver P.N.A. at all. Here it should be remembered that the metabolism of our scorbutic animals had been damaged so severely that they were almost dying at the time of analysis.

¹ J. N. DAVIDSON and C. WAYMOUTH, *Biochem. J.* **38**, 379 (1944). – J. N. DAVIDSON, *Biochem. J.* **39**, lix Proceedings (1945). – P. MANDEL, M. JACOB, and L. MANDEL, *Bull. Soc. Chim. biol.* **32**, 80 (1950). – H. W. KOSTERLITZ and I. D. CRAMB, *J. Physiol.* **102**, xviii Proceedings (1943). – H. W. KOSTERLITZ, *J. Physiol.* **106**, 194 (1947).

² A. SIBATANI, *Cytologia* **16**, 58 (1950).

³ W. C. SCHNEIDER, *J. biol. Chem.* **161**, 293 (1945).

⁴ Y. YAGI, in F. EGAMI, *Nucleic acids and nucleoproteins: physics, chemistry, biology, and medicine*, Tokyo **1**, 132 (1951), in Japanese.

⁵ M. FUKUDA and A. SIBATANI (in course of publication).

⁶ M. FUKUDA and A. SIBATANI (unpublished experiment).

⁷ J. N. DAVIDSON and I. LESLIE, *Cancer Res.* **10**, 587 (1950).

⁸ R. M. CAMPBELL and H. W. KOSTERLITZ, *J. Endocrinol.* **6**, 308 (1950). – S. LAGERSTEDT, *Acta Anat., Suppl.* **9** (1949).

Nucleic acids, proteins, and cell number of normal and scorbutic guinea pig livers at the same growth stage

Animal	Body weight initial g	Body weight at death g	Liver weight g	Total D.N.A.-P. mg	D.N.A. per nucleus $\mu\mu\text{g}$	Cell number $\times 10^6$	Total P.N.A.-P. mg	Total protein-N mg	P.N.A.-P protein-N	
Normal {	I	285	285	10.0	2.59	9.03	2890	6.32	247	0.026
	II	300	300	11.0	2.78	9.06	3100	6.63	253	0.026
	III	290	290	9.0	2.61	9.04	2920	5.89	202	0.029
	Mean	292	292	10.0	2.66	9.04	2970	6.28	234	0.027
	Scorbutic {	I	290	220	9.5	2.64	9.13	2920	6.52	212
II		290	220	8.6	2.83	9.06	3150	6.08	158	0.039
III		290	200	7.6	2.54	9.14	2810	6.14	161	0.038
Mean		290	213	8.6	2.67	9.11	2960	6.24	177	0.036
Per cent of normal		99	73	86	100	101	100	99	76	133
Rats in starvation: per cent of normal	100	66	47	99	98	101	35	44	76	

There is a report of Russian workers¹ suggesting that nuclei of scorbutic guinea pig livers contain less D.N.A. and more P.N.A. than nuclei from normal animals. They have speculated that ascorbic acid may be involved in the mechanism of D.N.A. biosynthesis. Nothing in our data seems to support such an idea, although these were obtained with whole liver tissues. The reason of the stability of P.N.A. in the ascorbic acid-deficient liver is not clear. Nor can the question be answered at present of whether this represents a blocking of both the breakdown and the biosynthesis of P.N.A. or the maintenance of balanced turnover activity during the whole period of ascorbic acid deficiency. The role of ascorbic acid in the metabolism of P.N.A. may be disclosed by enzymatic studies and isotopic experiments with scorbutic livers. It may then contribute something to the formulation of the underlying mechanism of the possible link between turnover or biosynthesis of P.N.A. and that of proteins², a question being at present subject to much discussion³.

MICHIO FUKUDA and ATUHIRO SIBATANI

Microbial Diseases Research Institute, University of Osaka, Doozima-Nisimati 7, Kitaku, Osaka, Japan, September 9, 1952.

Zusammenfassung

Ein Experiment mit an Skorbut sterbenden Meer-schweinchen. Der Proteinverlust der Leber bei diesen Tieren wird nicht von einer gleichzeitigen Verminderung der Pentosenukleinsäure begleitet; letztere bleibt vielmehr bis zum Tod normal.

¹ B. I. GOL'DSTEIN, D. V. VOL'KENZON, L. G. KONDRAT'eva, and N. D. UL'YANOVSKA, *Biokhimiya* 15, 173 (1950).

² E. JUNI, M. D. KAMEN, J. M. REINER, and S. SPIEGELMAN, *Arch. Biochem.* 13, 387 (1948). – P. C. CALDWELL, E. L. MACKOR, and C. HINSHELWOOD, *J. Chem. Soc.* 1950, 3151. – P. C. CALDWELL and C. HINSHELWOOD, *J. Chem. Soc.* 1950, 3156. – N. A. FLIASSON, E. HAMMARSTEN, P. REICHARD, S. ÅQVIST, B. THORELL, and G. EHRENSVÄRD, *Acta Chem. Scand.* 5, 431 (1951). – M. GRENSON, *Biochim. Biophys. Acta* 8, 481; 9, 162 (1952). – S. OSAWA and Y. HAYASHI (in course of publication).

³ H. B. LEVY, E. T. SKUTCH, and A. L. SCHADE, *Arch. Biochem.* 24, 206 (1949). – R. ABRAMS, *Arch. Biochem.* 30, 90 (1951). – R. JEENER, *Biochim. Biophys. Acta* 8, 125, 270 (1952). – I. E. HOKIN, *Biochim. Biophys. Acta* 8, 225 (1952). – I. LESLIE and J. N. DAVIDSON, *Biochim. Biophys. Acta* 7, 413 (1951). – Y. HAYASHI and S. OSAWA, *Science, Tokyo* 22, 474 (1952), in Japanese.

Cortison und die Leukozytenphagozytose

Wiederholt berichteten wir, dass infolge Reizung des N. splanchnicus in der Nebenniere ein Prinzip frei wird, welches die phagozytosefördernde Fähigkeit des Blutsersums steigert. Nach unseren Untersuchungen hatten weder Adrenalin noch wässrige Rindenextrakte, noch das «DOCA» *in vitro* eine unmittelbare Wirkung auf die Phagozytose¹. Es schien uns daher geboten, auch die Wirkung des Cortisons zu untersuchen.

Die Versuche wurden an Kaninchen bzw. an Ratten durchgeführt. Die Cortisonwirkung wurde zunächst an überlebenden Reizleukozyten geprüft, die wir aus der Bauchhöhle der Ratten nahmen. Mit der Methode nach WRIGHT wurde der Grad der Phagozytose bestimmt. Unsere Systeme enthielten 0,5 cm³ Leukozytensuspension (1 mm³:10 000 Zellen), 0,1 mm³ Rattenserum, 0,1 cm³ Bakteriensuspension (1 mm³:10 Millionen Keime) und Cortisonlösung (Cortison Acetat «MERCK») bzw. physiologische Kochsalzlösung. Nach einer einstündigen Inkubation im Thermostat wurde in gefärbten Ausstrichpräparaten die Zahl der von 400 Leukozyten aufgenommenen Bakterien (*Staphylococcus pyogenes aureus* bzw. *Typhusbazillen*) bestimmt. Die Resultate sind durch statistische Berechnungen belegt. Fehlergrenze der Berechnung (Streuung): $\sigma = \pm 9,57\%$.

Auf Grund der Untersuchungen lässt sich einheitlich feststellen, dass die Bakterienphagozytose der Leukozyten durch Cortison in einer Endkonzentration von 1 mg % nicht verändert wird², woraus folgt, dass das auf Wirkung der Splanchnikusreizung in der Nebenniere frei werdende phagozytosefördernde Prinzip nicht mit dem Cortison identisch sein kann.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden 10 Kaninchen für die Dauer von 1–3 Tagen i.m. mit Cortison behandelt. Die phagozytosefördernde Fähigkeit wurde nach 24 h mit Rattenleukozyten wie oben bestimmt. Über mehrere Tage hinweg wurde auch die Phagozytosefähigkeit der zirkulierenden Leukozyten des Tieres mit dem von uns modifizierten Verfahren von PLATONOV bestimmt.

Die Veränderungen der Mittelwerte unserer Versuche sind in beiden Abbildungen zu sehen.

¹ G. LUDÁNY, J. VAJDA und E. ERDÖS, *Arch. int. Pharmacodyn.* 87, 49 (1951). – F. KOKAS, G. LUDÁNY und J. VAJDA, *Quart. J. exp. Physiol.* 36, 89 (1951).

² G. LUDÁNY, J. VAJDA und R. BACKHAUSZ, *Arch. int. Pharmacodyn.* 89, 279 (1952).

Aus Abbildung 1 geht hervor, dass die phagozytosefördernde Fähigkeit des Kaninchenserums nach einmaliger Verabreichung von 20 mg Cortison für die Staphylokokken um –35 %, für die Typhusbazillen um –32 % abnimmt.

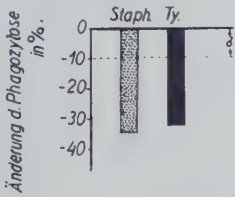


Abb. 1. Die Wirkung von Cortison (Cortisone Acetat «Merck», i. m. 20 mg/Tier) auf die phagozytosefördernde Fähigkeit des Bluteserums bei Kaninchen; Mittelwert von 5 Versuchen; 24 h nach der Cortisonverabreichung; die Streuung der Zählung: $\sigma = \pm 9,57\%$; Bakterienphagozytose von Leukozyten der Ratte.

Auch die zirkulierenden Leukozyten reagierten auf Cortisonbehandlung mit herabgesetzter Phagozytose. Abbildung 2 zeigt, dass der Effekt bereits nach 24 h in Erscheinung tritt. Der Grad der Verringerung ist ein bedeutender und übertrifft den σ -Wert um das Mehrfache. Für die Staphylokokken erhalten wir im Mittelwert –44 %, für die Typhusbakterien –36 %. Nach Beendigung der Cortisonbehandlung stellen sich die normalen Verhältnisse in 3–5 Tagen wieder ein.

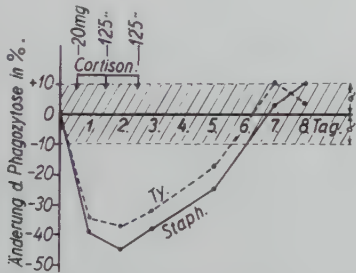


Abb. 2. Die Wirkung von Cortisonverabreichung auf die Bakterienphagozytose der Leukozyten bei Kaninchen; Mittelwert von 10 Versuchen.

Es gelang, die oben beschriebenen Befunde auch bei zwei Versuchspersonen nachzuweisen.

Unsere Versuche, über die wir an anderer Stelle eingehender berichten werden, stehen auch mit Beobachtungen anderer Autoren in Einklang. Interessant sind in dieser Hinsicht die Beobachtungen von WHITE und MARSHALL¹, wonach bei mit Cortison behandelten Kaninchen die i.v. injizierten Bakterien im Blute stärker vermehrt werden als bei den Kontrolltieren. Nach den neueren Feststellungen von CREPEA, MAGNIN und SEASTONE² nimmt die Immunphagozytose beim Menschen nach Verabreichung von Cortison ab. Auch klinische Beobachtungen sprechen dafür, dass – wenigstens unter gewissen Umständen – die Cortisonbehandlung von einer Generalisierung des Infektionsprozesses begleitet sein kann.

Entsprechende Resultate erhielten wir selber an Leukozyten, die in die Bauchhöhle einwanderten: die Phagozytose der Leukozyten cortisonbehandelter Ratten nahm an Intensität ab; daneben aber blieb die Auswan-

derungsintensität bei den behandelten Tieren unverändert¹. Unsere Untersuchungen mit ACTH sind im Gange.

G. LUDÁNY, J. VAJDA und E. TÓTH

Pathophysiologisches Institut der Universität Budapest, den 17. September 1952.

Summary

Cortisone is ineffective *in vitro* in a concentration of 1 mg % on the bacterium phagocytosis of rats leucocytes. Cortisone-treatment diminishes by 35 % the phagocytosis-promoting property of rabbits' blood serum even after 24 h. Doses of Cortisone in rabbits moderate the bacterium phagocytosis of leucocytes in circulation also. The change is greater than 40 % on an average. The effect is reversible and ceases in 3–5 days after discontinuing the dosing. Statistical calculations also support the results of phagocytosis-examinations performed according to WRIGHT and PLATONOV. The same results were obtained on two human cases.

¹ G. HORVÁTH, G. LUDÁNY, E. TÓTH und J. VAJDA (im Druck).

Rôle de la thyroïde dans l'action de la testostérone sur le thymus

L'influence des gonades sur le thymus est connue depuis fort longtemps¹. Quant aux modifications de la structure du thymus déterminées par les hormones sexuelles synthétiques, elles ont été décrites (à ma connaissance) la première fois par CHIODI². Sous l'influence de la testostérone (1,5 mg par jour pendant 10 jours), les lymphocytes du thymus diminuent grandement de nombre, surtout dans la corticale, il en résulte une diminution notable de poids de l'organe.

Ayant observé que l'influence du thymus sur l'action de la testostérone est liée à la présence de la thyroïde³, nous avons cru justifié de vérifier cette observation par l'étude des modifications du thymus chez l'animal thyroéoprive, sous l'influence de la testostérone.

Expérience. Cobayes mâles castrés et thyroéoprives (extirpation de la thyroïde 7 jours après la castration, animaux de 180 g au début). Dès le lendemain de la thyroïdectomie les animaux reçoivent des injections sous-cutanées de 6 γ de thyroxine par 100 g de poids vif et 48 h, afin d'empêcher l'atrophie thyroéoprive du thymus⁴. Au bout de 15 jours de ce traitement, les animaux reçoivent 4 injections de propionate de testostérone, espacées de 24 h, à raison de 100–250 γ par 100 g de poids vif et 24 h. Ils sont autopsiés le 5^e jour et leur thymus est comparé en coupe à celui de cobayes castrés ayant reçu les mêmes doses de testostérone.

Chez le castrat, sous l'influence de la testostérone, le thymus diminue de volume. La limite entre la corticale et la médullaire s'efface par suite de la diminution des lymphocytes. Les mitoses sont très nombreuses et il y a un grand nombre de petits corpuscules de HASSALL jeu-

¹ Voir littérature sur ce sujet dans J. A. HAMMAR, *Normal-morphologische Thymusforschung*, etc. (Barth, Leipzig 1936). Il est impossible de la citer ici.

² H. CHIODI, C. r. Soc. biol. 129, 866 et 1258 (1938); *Endocrinology* 26, 107 (1940).

³ J. COMSA, *Physiol. comp. Écol.* (sous presse).

⁴ J. COMSA, *J. Ann. endocr.* 12, 230 (1951).

¹ R. G. WHITE und A. H. E. MARSHALL, *The Lancet* 1951, 891.
² S. B. CREPEA, G. E. MAGNIN und C. V. SEASTONE, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 77, 704 (1951).

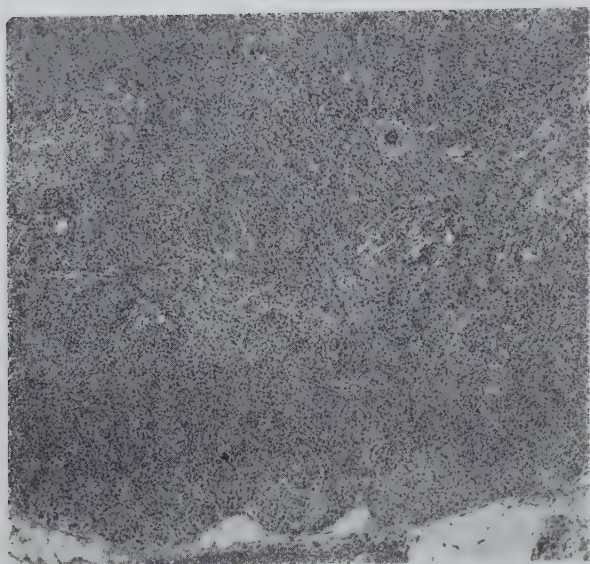


Fig. 1. Coupe d'un lobule thymique du cobaye ayant reçu 4 injections journalières de 200 μ de propionate de testostérone. (Bouin, hématoxyline-éosine, grossi 72 fois). Castrat.

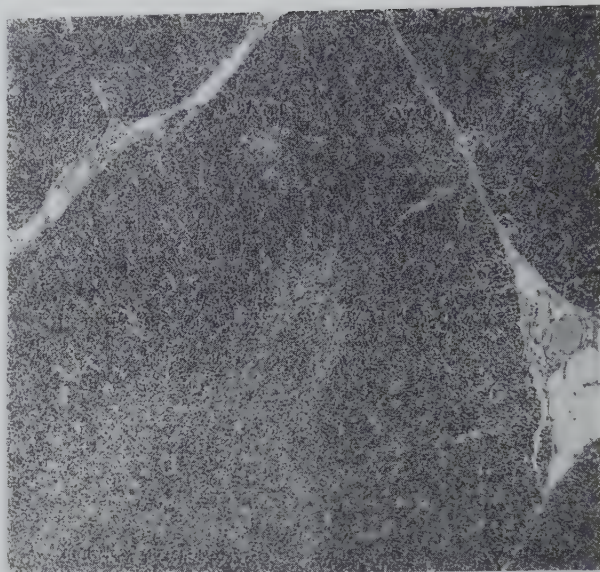


Fig. 2. Castrat thyroéoprive traité à la thyroxine.

nes (Fig. 1). (Cette description se superpose sensiblement à celle de CHIODI.) En même temps, la thyroïde de ces animaux a montré une image de stimulation nette (correspondant au degré +++ ou ++++ de JUNKMANN et SCHÖLLER).

Chez la castrat thyroéoprive traité à la thyroxine, le thymus reste sensiblement normal de taille et de structure (fig. 2). La testostérone n'a manifestement pas modifié l'aspect de l'organe. On peut conclure que l'action de la testostérone sur le thymus, dans les conditions de notre expérience, s'est montrée liée à la présence de la thyroïde. (Elle peut être considérée comme la conséquence de la stimulation de celle-ci par la testostérone.)

J. COMSA

Clinique infantile, Université de Strasbourg, le 17 octobre 1952.

Summary

In castrated guinea pigs injected with testosterone propionate (100–250 μ per 100 g daily for 4 days), the thymus underwent atrophic modifications, characterized chiefly by the diminution of the lymphocytes.

In thyroidectomized castrates, injected with thyroxine (6 μ per 100 g and 24 h) in order to prevent the thyroprive atrophy of the thymus, testosterone injections failed to produce any modifications of the thymus.

Thus structural changes induced by testosterone injections could be interpreted as the consequence of the stimulation of the thyroid by this hormone.

L'azione di alcuni alcaloidi diidrogenati della segale cornuta nell'edema polmonare acuto sperimentale da adrenalina

Recenti ricerche hanno messo in evidenza che alcuni alcaloidi diidrogenati della segale cornuta (Hydergin) esercitano una azione protettiva verso l'edema polmonare provocato sperimentalmente nei conigli con la somministrazione di adrenalina per via endovenosa (PAOLINI¹).

¹ A. PAOLINI, *Exper.* 6, 234 (1950).

In base a questo effetto protettivo, messo in rapporto con le proprietà simpaticolitiche degli stessi alcaloidi, ampiamente dimostrate da ROTHLIN¹, è stata affermata la partecipazione del sistema nervoso simpatico nella patogenesi dell'edema polmonare acuto da adrenalina, partecipazione già sostenuta da altri Autori.

Nelle condizioni sperimentali adottate per condurre queste ricerche mancano tuttavia a nostro parere i presupposti che permettano di giungere alla dimostrazione di questo assunto. Se si considera infatti che la patogenesi dell'edema polmonare acuto da adrenalina riconosce come condizione scatenante la brusca e violenta puntata ipertensiva provocata dal farmaco sia nel grande che nel piccolo circolo, l'azione protettiva esercitata dagli alcaloidi diidrogenati della segale cornuta va posta in relazione con la proprietà che queste sostanze hanno di inibire completamente o addirittura di annullare gli effetti ipertensivi dell'adrenalina (ROTHLIN). La loro somministrazione preventiva induce pertanto una profonda modificazione del meccanismo emodinamico che costituisce il primo e fondamentale momento della complessa patogenesi dell'edema polmonare acuto da adrenalina, analogamente a quanto si può ottenere con procedimenti chirurgici (legatura della vena cava inferiore o delle vene sovraepatiche) che si sono in effetti dimostrati atti a proteggere l'animale da questa varietà di edema (REICH e MONTORSI²).

Per potere mettere in evidenza un eventuale intervento del sistema nervoso simpatico nella patogenesi dell'edema polmonare acuto da adrenalina e per poter saggiare gli effetti degli stessi alcaloidi della segale cornuta su questa componente patogenetica abbiamo cercato di realizzare condizioni sperimentali che ci permettessero di lasciare immutate le condizioni emodinamiche indotte dall'adrenalina. Abbiamo pertanto condotto una serie di esperimenti atti ad analizzare l'entità e la durata dell'ipertensione provocata sul grande circolo dalle dosi edematogene di adrenalina da noi adottate. Tali esperimenti, effettuati per mezzo della registrazione

¹ E. ROTHLIN, *Bull. Acad. suisse des Sc. Méd.* 2, 249 (1946/47).

² M. REICH e W. MONTORSI, *Quad. Sci. Smeraldo* 6, 15 (1950).

grafica della pressione arteriosa dei conigli ottenuta con ago-cannula introdotto in una delle carotidi e collegato con un manometro a mercurio posto dinanzi alla fessura del tensiografo di CONDORELLI¹, hanno costantemente dimostrato che la dose di 1 mg pro chilogrammo di adrenalina iniettata lentamente nella vena marginale dell'orecchio induce una immediata e pronunciata elevazione dei valori pressori, che dopo la fine dell'iniezione tendono a diminuire lentamente per tornare infine ai valori di partenza nello spazio di 5-6 min dalla iniezione stessa. Successivamente si osservano brusche cadute dei valori pressori ai quali l'animale reagisce con fenomeni convulsivi, ed infine un abbassamento più cospicuo della pressione stessa contemporaneo allo scatenarsi della sintomatologia caratteristica dell'edema polmonare acuto.

In una seconda serie di esperimenti abbiamo proceduto alla somministrazione della stessa dose edematigena di adrenalina ad un lotto di conigli di media taglia e di ambo i sessi; negli animali che ancora sopravvivevano a distanza variabile da 5 a 22 min dalla somministrazione di adrenalina si è proceduto alla somministrazione per via endovenosa di una dose di 0,3 mg di Hydergin. Allo scopo di controllare l'effetto edematigeno della dose di adrenalina da noi adottata un secondo lotto di conigli è stato trattato con sola adrenalina. Di tutti gli animali sono stati determinati il peso corporeo, il tempo di sopravvivenza ed in caso di morte il peso ed i caratteri dei polmoni.

I dettagli dell'esperimento sono riportati nella seguente tabella:

Numero	Peso in kg	Adre- nalina mg/kg	Hyder- gin mg/kg	Tempo trascorso tra i due farmaci (in minuti)	Esito	Peso pol- moni in g
1	1,50	1	0,30	5	vive	
2	1,80	1	0,30	5	vive	
3	1,80	1	0,30	10	vive	
4	1,65	1	0,30	10	vive	
5	1,70	1	0,30	10	vive	
6	1,35	1	0,30	5	vive	
7	1,25	1	0,30	6	vive	
8	1,95	1	0,30	8	vive	
9	1,45	1	0,30	8	vive	
10	1,40	1	0,30	8	muore dopo 10 h	18
11	1,50	1	0,30	4	muore dopo 1 h 30 min	19
12	1,80	1	0,30	10	vive	
13	1,70	1	0,30	22	vive	
14	1,60	1	0,30	14	vive	
15	1,55	1	0,30	10	vive	
16	1,65	1	—	—	muore	19
17	1,90	1	—	—	muore	18
18	1,50	1	—	—	muore	19
19	2,00	1	—	—	muore	19
20	2,05	1	—	—	muore	22
21	1,50	1	—	—	muore	21
22	1,75	1	—	—	muore	15
23	1,60	1	—	—	muore	17
24	1,60	1	—	—	muore	17
25	1,80	1	—	—	muore	18
26	1,60	1	—	—	muore	19
27	1,70	1	—	—	muore	21
28	1,60	1	—	—	muore	17
29	1,55	1	—	—	muore	15
30	1,90	1	—	—	muore	20

N.B. I conigli N° 11, 13 e 14 hanno ricevuto l'Hydergin durante la crisi di edema polmonare acuto.

¹ L. CONDORELLI, Acta Cardiol. 6, 1 (1951).

I risultati ottenuti mettono in evidenza come gli alcaloidi diidrogenati della segale cornuta da noi sperimentati (Hydergin Sandoz) conservino una spiccata azione antiedematigena anche quando il complesso meccanismo patogenetico dell'edema polmonare acuto da adrenalina è giunto ad una fase molto avanzata.

È da sottolineare il fatto che il farmaco appare dotato di una sorprendente azione curativa se viene somministrato durante lo svolgimento dell'edema stesso: in tre animali infatti la iniezione di Hydergin effettuata quando già si osservava l'emissione del caratteristico escreato schiumoso ha provocato un rapido arresto della sintomatologia, portando addirittura in due casi alla sopravvivenza degli animali trattati.

Le condizioni sperimentali nelle quali sono state realizzate le nostre ricerche ci autorizzano ad attribuire l'effetto protettivo e curativo dell'Hydergin alle sue proprietà simpaticolitiche, ed a confermare la partecipazione del sistema simpatico alla patogenesi di questa varietà di edema polmonare acuto sperimentale.

F. TESTONI e G. LOMEO

Istituto di Patologia speciale Medica e Metodologia Clinica dell'Università di Roma, il 4 ottobre 1952.

Zusammenfassung

Die im Hydergin enthaltenen dihydrierten Mutterkornalkaloide entfalten eine Schutzwirkung gegen das akute experimentelle Lungenödem durch Adrenalin beim Kaninchen bei Darreichung sowohl während einer weit fortgeschrittenen Wirkungsphase des Pharmakons wie auch während der Krise selbst. Solche Eigenschaften, welche der sympathikolytischen Wirkung des Hydergins zuzuschreiben sind, bestätigen die Teilnahme des sympathischen Nervensystems in der Pathogenese dieser Art von akutem experimentellem Lungenödem.

L'azione di alcuni alcaloidi diidrogenati della segale cornuta nell'edema polmonare acuto sperimentale da cloropicrina

È tuttora oscuro il meccanismo patogenetico dell'edema polmonare acuto; le numerose ricerche di ordine clinico e sperimentale già eseguite in questo campo hanno però messo in luce la complessità e la molteplicità dei momenti causali che intervengono nel suo determinismo. Tra questi è stata dimostrata l'importanza di un fattore puramente emodinamico consistente nell'iperafflusso di sangue nel piccolo circolo con conseguente elevazione critica della pressione vigente nel sistema dell'arteria polmonare, di un fattore umorale rappresentato dalla liberazione a livello del parenchima polmonare di sostanze vasoattive istaminosimili che determinano un brusco aumento della permeabilità capillare, ed infine di un fattore nervoso consistente secondo alcuni autori in presunti stimoli edematigeni di origine centrale o riflessa che raggiungerebbero il parenchima polmonare attraverso le vie efferenti simpatiche.

Un notevole contributo alla chiarificazione del problema patogenetico dell'edema polmonare acuto umano viene fornito dallo studio delle numerose forme di edema polmonare acuto sperimentale, ottenibili con vari mezzi meccanici e specie con la somministrazione di determinati farmaci; anche qui le ricerche finora compiute hanno dimostrato che la patogenesi delle diverse forme di edema polmonare acuto sperimentale è tutt'altro che

univoca. Mentre infatti l'intervento di un fattore umorale sembra ben confermato dall'azione protettiva svolta dalle sostanze aventi effetto antiistaminico, appare talora problematica in varie forme la partecipazione del fattore emodinamico o del fattore nervoso; anche le recenti ricerche condotte da PAOLINI tenderebbero ad esempio ad escludere l'intervento del sistema nervoso simpatico nella patogenesi dell'edema polmonare acuto da tiourea o da salicilato di metile, intervento che lo stesso autore ritiene dimostrato nell'edema polmonare acuto da adrenalina¹.

Allo scopo di mettere in evidenza l'eventuale presenza di un meccanismo nervoso nella patogenesi dell'edema polmonare acuto sperimentale ottenibile nei conigli con la somministrazione per via endovenosa di una soluzione di cloropirina, abbiamo condotto una serie di ricerche intese a stabilire l'influenza degli alcaloidi diidrogenati della segale cornuta su questa particolare varietà di edema polmonare acuto sperimentale. Le ricerche sono state effettuate su conigli di razza nostrana, di ambo i sessi e di media taglia, ai quali venivano somministrate per via endovenosa dosi variabili di Hydergin Sandoz e successivamente a queste una dose sicuramente edematigena di cloropirina. Parallelamente un gruppo di animali da esperimento è stato trattato esclusivamente con le stesse dosi di cloropirina.

Riportiamo nelle seguenti tabelle i dettagli dell'esperimento:

Tabella Ia

Numero	Peso in kg	Hydergin in mg/kg	Cloropirina in mg/kg	Durata della sopravvivenza	Peso dei polmoni in g
1	1,9	0,10	15	45 m	20
2	1,5	0,10	15	2 h	19
3	1,8	0,15	15	12 h	22
4	1,5	0,15	15	vive	—
5	1,3	0,15	15	18 m	12
6	1,7	0,15	15	12 h	17
7	1,7	0,15	15	10 h	17
8	1,7	0,15	15	2 h	16
9	2,0	0,15	15	6 h	20
10	1,4	0,15	15	18 m	13
11	1,4	0,15	15	50 m	23
12	1,8	0,15	15	20 m	19
13	1,5	0,30	15	31 m	9
14	1,3	0,30	15	18 m	13
15	1,5	0,30	15	30 m	21
16	1,6	0,30	15	50 m	14
17	1,7	0,30	15	1 h	21
18	1,5	0,30	15	2 h	18
19	1,4	0,30	15	1 h	23
20	1,8	0,30	15	50 m	20
21	1,6	0,30	15	30 m	17
22	1,6	0,30	15	40 m	18
23	1,5	—	15	35 m	18
24	1,3	—	15	20 m	13
25	2,0	—	15	50 m	17
26	1,3	—	15	50 m	17
27	1,9	—	15	30 m	18
28	1,6	—	15	4 h	21
29	1,5	—	15	2 h	29
30	1,8	—	15	1 h	22
31	1,5	—	15	50 m	24
32	1,6	—	15	2 h	17
33	1,7	—	15	6 h	20
34	1,4	—	15	15 m	23
35	1,5	—	15	20 m	25
36	1,4	—	15	20 m	22
37	1,3	—	15	30 m	19

¹ A. PAOLINI, Exper. 6, 234 (1950).

Tabella II^a

Conigli trattati	Hydergin (mg/kg)	Cloropirina (mg/kg)	ESITO	
			morti	sopravvissenti
15	—	15	15	—
2	0,10	15	2	—
10	0,15	15	9	1
10	0,30	15	10	—

Dall'esame dei dati riportati nelle tabelle si può concludere che gli alcaloidi diidrogenati della segale cornuta contenuti nell'Hydergin non hanno esercitato, con le dosi e nelle condizioni da noi adottate, alcun effetto protettivo sull'edema polmonare acuto da cloropirina nel coniglio.

I nostri risultati ci portano a ritenere che in questa varietà di edema polmonare acuto sperimentale non si abbia alcuna partecipazione del sistema nervoso simpatico, contrariamente a quanto è stato dimostrato per altre varietà e particolarmente per l'edema polmonare acuto da adrenalina.

F. TESTONI e V. MOSCATO

Istituto di Patologia speciale Medica e Metodologia Clinica dell'Università di Roma, il 4 ottobre 1952.

Zusammenfassung

Die im Hydergin enthaltenen dihydrierten Mutterkornalkaloide zeigen keine Schutzwirkung gegen das experimentelle akute Lungenödem durch Chlorpikrin beim Kaninchen. Diese Feststellung schliesst die Teilnahme des sympathischen Nervensystems in der Pathogenese dieser Art von akutem experimentellem Lungenödem aus.

Ricerche sull'A.C.T.H. del sangue: Attività dell'ultrafiltrato

Recenti ricerche di BORNSTEIN e TREWHELLA¹ e nostre² eseguite con differenti tecniche hanno concordemente dimostrato che il sangue di uomo normale possiede attività corticotropa. Analoga attività è stata messa in evidenza del tutto recentemente da SYDNOR e SAYERS³ anche per il sangue di ratto con la tecnica della separazione ed arricchimento su ossicellulosa, già indicata da ASTWOOD⁴ per l'isolamento dell'ormone corticotropo dall'ipofisi.

Sulla natura dell'A.C.T.H. ematico non si ha, a tutt'oggi, a differenza di quello ipofisario, alcuna nozione.

Noi tuttavia abbiamo potuto osservare che la sostanza corticotropa del sangue non viene integralmente precipitata dall'acetone ad alta concentrazione (94%), fatto questo confermato da SYDNOR e SAYERS³; inoltre abbiamo potuto stabilire che la scomparsa totale dell'attività corticotropa naturale del plasma (conservato alla temperatura ambiente di 20°C circa) avviene in circa 12 ore a differenza dell'A.C.T.H. ipofisario addizionato

¹ J. BORNSTEIN e P. TREWHELLA, Lancet 2, 678 (1950).

² L. MONTANARI, M. MARTINELLI, C. A. ROSSI e G. MORUZZI, J. A.M.A. 147, 525 (1951).

³ K. L. SYDNOR e G. SAYERS, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 79, 432 (1952).

⁴ E. B. ASTWOOD, M. S. RABEN, R. W. PAYNE e A. B. GRADY, J. Amer. Chem. Soc. 75, 2929 (1951).

Esperimento N°	Soggetto in esperimento	N° dei ratti usati per il saggio			Diminuzione media dell'acido ascorbico tra surrenale sinistra e destra (mg per 100 g di organo fresco)		
		Plasma	Ultrafiltrato	Residuo ultra- filtrazione	Plasma	Ultrafiltrato	Residuo ultrafiltrazione
1	normale	3	3	4	35,1 ± 7,2	41,9 ± 8,6	2,3
2	normale	3	3	—	30,6 ± 5,8	34,0 ± 6,8	—
3	normale	2	3	3	47,4 ± 8,0	56,6 ± 7,1	4,6
4	normale	4	3	—	26,3 ± 5,2	45,1 ± 7,7	—
5	normale	3	3	3	38,6 ± 6,7	55,5 ± 4,8	3,8
6	normale	3	3	—	13,9 ± 6,2	22,7 ± 9,1	—
7	normale	3	4	—	36,3 ± 9,1	39,5 ± 5,3	—
8	normale	3	2	—	21,3 ± 4,8	29,6 ± 6,6	—

al plasma (seppure a 37°C) che scompare in pochi minuti¹.

Queste osservazioni ci hanno indotto a supporre che l'A.C.T.H. del sangue fosse di struttura chimica differente da quello ipofisario a p.m. 20000², e probabilmente più semplice.

D'altra parte le preparazioni attive con strutture peptidiche presumibilmente molto semplici sono state ottenute anche dall'ipofisi per ultrafiltrazione di opportuni estratti (CORTIS-JONES e collaboratori³; MORUZZI e collaboratori⁴) o per dialisi di un idrolisato con pepsina dell'ormone ipofisario (BRINK e collaboratori)⁵, o addirittura per estrazione dei liquidi tricloroacetici usati per la precipitazione dello stesso ormone (GESCHWIND e collaboratori⁶). L'attività ormonale si deve quindi ritenere collegata non all'intera molecola proteica, ma ad una frazione di essa costituita da pochi (sette od otto) aminoacidi (LI⁷; BRINK e collaboratori⁸; MORUZZI e collaboratori⁹).

Le ricerche sull'attività corticotropa del plasma umano e del relativo ultrafiltrato che riferiamo hanno appunto lo scopo di stabilire se l'A.C.T.H. presente nel sangue ha una struttura semplice come quella suaccennata e tale da poter ultrafiltrare.

Parte sperimentale. Gli esperimenti sono stati eseguiti su sangue d'individuo normale tra i 20 e i 45 anni di età. L'attività corticotropa del plasma e relativo ultrafiltrato venne determinata con il test dell'acido ascorbico nel ratto ipofisectomizzato¹⁰ con il metodo da noi già indicato¹¹ iniettando in ogni caso 0,5 cm³ di liquido. L'ultrafiltrazione veniva effettuata ad una pressione di 15 atmosfere in gas inerte (azoto) a +2°C attraverso una membrana di cellophan in un ultrafiltrato appositamente costruito e che permette di ultrafiltrare rapidamente ed a

bassa temperatura, ad evitare perdite di attività corticotropa¹. L'ultrafiltro è in bronzo nichelato e le sue caratteristiche appaiono dalla figura 1. La parte centrale poggia su di un disco di plexiglas di mm 6 di spessore (E) e munito di fori del diametro di 1 mm. Sul plexiglas si pone un disco di carta da filtro e quindi uno di cellophan per dialisi.

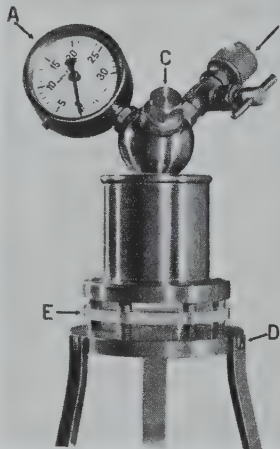


Fig. 1. Ultrafiltro semiaperto. ø interno mm 48, altezza mm 50; A = manometro per pressione; B = raccordo per immissione del gas, C = foro a vite per introduzione del liquido, D = fondo acciaio inossidabile, E = disco di plexiglas.

Immeso il plasma (foro C) e quindi il gas inerte fino a pressione di 15 atmosfere, si chiude il rubinetto B e si pone l'apparecchio in ghiacciaia a +2°C. Usando 8 cm³ circa di plasma si ottiene, in 60-90 min, una quantità di ultrafiltrato sufficiente per i saggi su almeno 3 animali. L'ultrafiltrato è incolore, limpido, non intorbidisce né al calore, né per aggiunta di acido tricloroacetico o di altri reattivi dealbuminanti.

In tre casi si è saggiata pure l'attività del residuo dell'ultrafiltrato; a tale scopo il residuo veniva ripreso con una quantità di soluzione fisiologica corrispondente al plasma ultrafiltrato. I risultati riguardanti plasma ed ultrafiltrato di otto individui normali (uomo) sono riportati nella tabella.

Controlli eseguiti con soluzione fisiologica (0,5 cm³ per 100 g di peso corporeo) hanno dato diminuzioni dell'acido ascorbico di minima entità e corrispondenti a quelle osservate con il residuo dell'ultrafiltrato.

Per una valutazione quantitativa dell'A.C.T.H. ematico in Unità Internazionali abbiamo tracciato una curva

¹ M. REISS, F. E. BADRICK, I. D. K. HALKERSTON e C. PLAICE, *Nature* 168, 206 (1951).
² C. H. LI, H. M. EVANS e M. E. SIMPSON, *J. Biol. Chem.* 149, 413 (1943).
³ B. CORTIS-JONES, A. C. CROOKE, A. A. HENLY, P. MORRIS e C. J. O. R. MORRIS, *Biochem. J.* 46, 173 (1950).
⁴ G. MORUZZI, L. MONTANARI, C. A. ROSSI, A. RABBI e G. JACCOLI, *Boll. Soc. it. Biol. sper.* 26, 1567 (1950).
⁵ N. G. BRINK, M. A. P. MEISINGER e K. FOLKERS, *J. Amer. Chem. Soc.* 72, 1040 (1950).
⁶ I. I. GESCHWIND, G. P. HESS, P. G. CONDLIFFE, H. M. EVANS e M. E. SIMPSON, *Science* 112, 436 (1950).
⁷ C. H. LI, *Pituitary-Adrenal Function*, edited by RUTH C. CHRISTMAN, Amer. Ass. Adv. Sci. (Washington, 1950).
⁸ N. G. BRINK, M. A. P. MEISINGER e K. FOLKERS, *J. Amer. Chem. Soc.* 72, 1040 (1950).
⁹ G. MORUZZI, L. MONTANARI, C. A. ROSSI, A. RABBI e G. JACCOLI, *Boll. Soc. it. Biol. sper.* 26, 1567 (1950).
¹⁰ M. A. SAYERS, G. SAYERS, and L. A. WOODBURY, *Endocrinology*, 42, 379 (1948).
¹¹ L. MONTANARI, M. MARTINELLI, C. A. ROSSI e G. MORUZZI, *l. c.*

¹ L. MONTANARI, M. MARTINELLI, C. A. ROSSI e G. MORUZZI, *J. A.M.A.* 147, 525 (1951).

con la preparazione standard Internazionale¹ della quale 1 mg = 1 unità. I saggi sull'animale ipofisectomizzato sono stati eseguiti con 1-0,5-0,25 mu (milliunità) ed i risultati sono riportati nel grafico della figura 2.

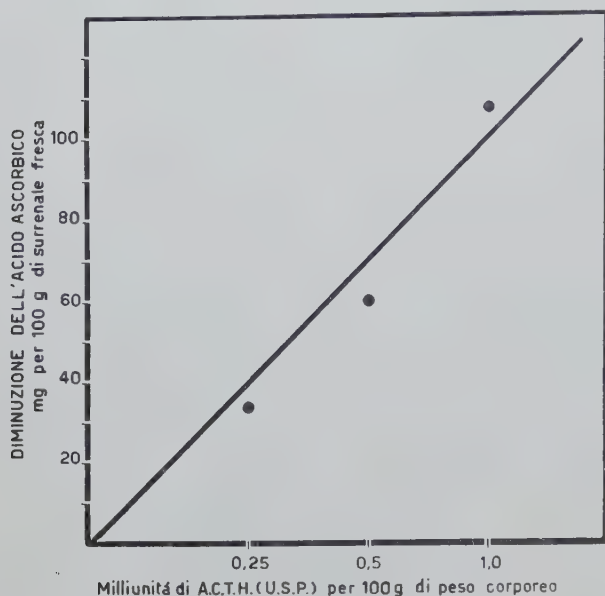


Fig. 2. Diminuzione dell'acido ascorbico nelle surrenali per somministrazione endovena di A.C.T.H. (Provisional U.S.P. Corticotropin Reference Standard).

Tenendo presente che la diminuzione media dell'acido ascorbico nelle surrenali determinata da 0,5 cm³ di plasma è di $31,18 \pm 3,73$ e quella dell'ultrafiltrato è di $40,6 \pm 4,19$, si può dedurre in base al grafico della figura 2 che il contenuto di A.C.T.H. è di 40 mu per 100 cm³ di plasma e di 52 mu per 100 cm³ di ultrafiltrato.

Conclusioni. Dai dati riportati appare innanzitutto confermato che il plasma di individuo normale possiede attività corticotropa. Anche se le diminuzioni di acido ascorbico nelle surrenali osservate con la nostra tecnica (iniettando 0,5 cm³ di plasma fresco per 100 g di peso corporeo) non sono molto elevate, purtuttavia noi riteniamo che questi dati siano sufficientemente significativi, tanto più se si tengono presenti i risultati ottenuti nelle prove in bianco usando soluzione fisiologica. D'altra parte col nostro ceppo di ratti, tali dati corrispondono a quelli ottenuti usando 0,25-0,50 mu della preparazione standard Internazionale.

Una tecnica d'arricchimento, che permetta cioè di concentrare l'A.C.T.H. ematico prima del saggio, come quella prospettata recentemente da SYDNOR e SAYERS², noi la riteniamo consigliabile qualora si osservino abbassamenti dell'acido ascorbico nelle surrenali molto limitati. A questo riguardo ricerche comparative sono in corso da parte nostra.

Per i soggetti esaminati (tabella) il plasma presenta un'attività corticotropa corrispondente ad un valore medio di 40 mu di A.C.T.H. per 100 cm³, mentre per l'ultrafiltrato è di 52 mu per 100 cm³ e cioè lievemente superiore. Senza voler per ora attribuire un significato

a questa differenza che potrebbe rientrare nei limiti di errore sperimentale, risulta chiaramente, che la sostanza corticotropa del plasma è totalmente ultrafiltrabile. Ciò appare non solo dal valore medio, ma anche dai dati singoli riferentisi a ciascun plasma. Una conferma si ha nell'osservazione che i residui della ultrafiltrazione esaminati non presentano alcuna attività.

In base pertanto ai risultati ottenuti, noi siamo portati a confermare che: il sangue di uomo normale ha un'attività corticotropa ed a precisare che l'A.C.T.H. ematico è in forma relativamente semplice e tale da poter ultrafiltrare.

C. A. ROSSI, L. MONTANARI,
M. MARTINELLI e G. MORUZZI

*Istituto di Chimica biologica dell'Università di Bologna,
il 15 ottobre, 1952.*

Summary

Corticotrophic activity of human plasma as well as of the relative ultrafiltrates has been assayed by the ascorbic acid depletion test on hypophysectomized rats.

It is further confirmed that human plasma displays a corticotrophic activity (40 mu per 100 cm³), and that blood A.C.T.H. is totally ultrafiltrable (52 mu per 100 cm³).

This may lead to the conclusion that A.C.T.H. may be present in blood in a relatively simple form.

New Method of Staining of Bacterial Capsules in Films and Sections

It is well known that many polysaccharides are present in bacterial cells. Such polysaccharide substances are more or less directly related to infectious or immunological phenomena.

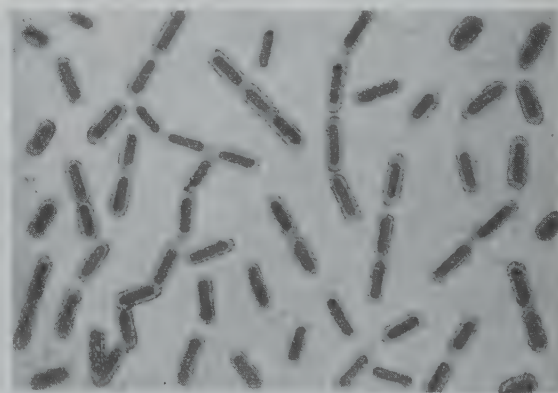


Fig. 1.—*Klebsiella pneumoniae*. Alcian Blue - Carbolie Fuchsin. 1:2000.

Very interesting are the polysaccharides which form a capsule to some of the bacterial cells. The importance of this capsule lies in the fact that it is connected with virulence and specificity of germs. However, the practical demonstration of bacterial capsules in films and sections is very difficult; several staining procedures have been devised, but the results obtained have not been satisfactory. Good results have now been obtained from the following process, with which I have succeeded in demonstrating the bacterial capsules in films and sections.

¹ Ringraziamo l'American Committee University of Bologna di New York che ci ha gentilmente procurato il Provisional U.S.P. Corticotropin Reference Standard.

² K. L. SYDNOR e G. SAYERS, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 79, 432 (1952).

The method is based on the introduction of a staining substance called "Alcian Blue 8GN 150"¹, which has great affinity for the bacterial capsules. I have also been able to establish that an affinity for this staining substance is maintained by isolated polysaccharides and disappears after enzymatic demolition of capsular polysaccharide substance. This fact suggests, with great probability, a specificity towards staining.



Fig. 2.—Pneumococcus III. Alcian Blue - GRAM's staining. 1:1200.

Staining solution: Alcian Blue 8GN 150 1 g
Alcohol absolute 100 g

For staining use 1 drop of this solution to 1 cm³ of distilled water.

Method of staining

(A) In films:

- (1) Dry thin, evenly spread films in the air and fix by passing through a flame.
- (2) Cover the films with the diluted solution of Alcian Blue for 1 min.
- (3) Wash in tap water.
- (4) Counterstain with a solution diluted 1:100 ZIEHL-NEESEN's carbolic fucsin for 3-5 s.
- (5) Wash well in tap water.
- (6) Dry and examine.

(B) In sections:

- (1) Fix in 10% formalin and embed in paraffin.
- (2) Treat paraffin sections in the usual way up to water.
- (3) Stain the sections in freshly diluted solution of Alcian Blue for 5 min.
- (4) Wash in distilled water.
- (5) Counterstain with diluted solution (1:100) of ZIEHL's carbolic fucsin for 5 s.
- (6) Wash well in distilled water.
- (7) Differentiate very quickly in 95% alcohol.
- (8) Dehydrate in absolute alcohol.
- (9) Clear in xylol and mount in balsam.

The bacterial capsules are blue, bacteria are red. It is also possible to make use of a GRAM's staining instead of simple ZIEHL's carbolic fucsin, but in this case it is advisable to reapply the solution of Alcian Blue after the alcoholic differentiation for 1 min. Of course the contrast between the capsula and Gram-positive bacteria is less evident.

Finally the method is very easy to perform and always gives good results. Excellent results have also been obtained in staining the walls of fungi.

A. NOVELLI

Department of General Pathology and Bacteriology,
University of Genoa, August 26, 1952.

Riassunto

Viene descritto un nuovo metodo di colorazione delle capsule batteriche, su strisci e nei tessuti, basato sull'impiego di un nuovo colorante: l'Alcian Blue 8GN 150. Tale colorante ha dimostrato di possedere un'affinità per i polisaccaridi capsulari.

Il metodo, di semplice e rapida esecuzione, è pure indicato per la colorazione delle pareti cellulari dei miceti.

PRO EXPERIMENTIS

Über Arbeitsstörungen bei serologischen Untersuchungen, verursacht durch ein Waschmittel

Im Sommer und Herbst 1951 befassten wir uns mit der Hämagglutination nach MIDDLEBROOK und DUBOS (HMD.) für die Untersuchung auf Rindertuberkulose.

Die Arbeitstechnik entsprach den Angaben von BRODHAGE¹.

Als Testflüssigkeit dienten die mit Tuberkulin (PPD.-Kopenhagen) sensibilisierten und in der Kochsalzlösung suspendierten Hammelerythrozyten.

Die Proben wurden in Kahn'schen Röhrchen angesetzt, jedem Röhrchen, das 0,3 cm³ der entsprechenden Serumverdünnung enthielt, wurde die gleiche Menge (0,3 cm³) Testflüssigkeit hinzugefügt. Nach zweistündigem Bebrüten im Thermostat wurden die Gläser bei Zimmertemperatur die Nacht hindurch aufbewahrt, anschliessend die Resultate abgelesen.

Im Verlauf von etwa 6 Wochen stellten sich Störungen ein, indem die für die Testierung der Proben zugesetzte Erythrozytenaufschwemmung hämolytisch wurde. Die Hämolyse betraf in erster Linie die hohen Serumverdünnungen, indem sie zuerst die Testflüssigkeitskontrolle (Testflüssigkeit + NaCl) angriff, um dann stufenweise auf die höchsten Serumverdünnungen überzugehen, wobei die niedrigen meistens intakt blieben. Die Zeit des Hämolyseauftretens beschränkte sich auf 20-30 min nach der Abfüllung der Testflüssigkeit, unabhängig von der Temperatur, sowohl im Zimmer wie auch im Thermostat.

Nachdem die Nachprüfung sämtlicher Reagenzien auf Reinheit und die Verwendung von Erythrozyten anderer Tiere keine Änderung bewirkten, wurden sämtliche an der Reaktion beteiligten Substanzen in ein anderes Institut verbracht und die Reaktion mit den dortigen Gläsern angesetzt. Die Hämolyse trat hier nicht auf².

Als dies festgestellt war, unterlag es schon keinem Zweifel mehr, dass der Fehler irgendwie mit unsern Gläsern zusammenhing. Da wir aber diese Röhrchen früher störungslos verwendet hatten, musste der Fehler nicht auf das Glasmaterial selbst, sondern nur auf die Reinigungsart zurückgeführt werden. Zur Zeit wurde in un-

¹ H. BRODHAGE, Acta Davosiana, 10, H. 4 (1951).

² Schweizerisches Forschungsinstitut für Tuberkulose in Davos.

¹ Produced by Imperial Chemical Industries Limited, London.

serem Labor als übliches Reinigungsmittel das Präparat «Vel»¹ gebraucht, während demselben Zwecke im Schweizerischen Forschungsinstitut für Tuberkulose in Davos gewöhnliche Schmierseife diente. Nachdem wir unsere Gläser sorgfältig in Chromschwefelsäure ausgewässert und anschliessend in destilliertem Wasser während 2 h ausgekocht hatten, wurden die Störungen nicht mehr beobachtet.

Darauf sandten wir einige unserer mit Vel gereinigten Gläser dem Schweizerischen Forschungsinstitut für Tuberkulose in Davos, wo sich die Hämolyse ebenfalls einstellte².

Nachträglich konnte in einem Versuch mit einer Vel-Verdünnungsreihe von 1:1000 bis 1:1024000 in Pufferlösung mit Erythrozytenaufschwemmung festgestellt werden, dass noch die Vel-Verdünnung 1:64000 die Erythrozyten zu hämolysieren imstande war. Die Hemmung der Hämolyse, die in den am Anfang der Serumverdünnungsreihe stehenden Gläsern auftrat, lässt sich durch die Schutzwirkung der Eiweisskolloide erklären.

K. BIRN

Veterinärbakteriologisches Institut der Universität Bern,
den 9. September 1952.

Summary

A source of disturbance in certain serological experiments was removed after 6 weeks of search, when it was discovered to be caused by traces of the product «Vel» (a washing powder) with the glass-ware was cleaned.

¹ Colgate Palmolive AG., Zürich.

² Briefliche Mitteilung.

PRO LABORATORIO

Fortlaufende Venendruckregistrierung am Menschen mittels pneumatischer Druckübertragung

Das von WILBRANDT¹ in Analogie zur Elektronenröhre entwickelte Verfahren der pneumatischen Druckverstärkung bzw. Druckübertragung gestattet bei geeigneter Modifikation eine fortlaufende Registrierung des peripheren venösen Druckes ohne wesentliche Volumverschiebung. Das Prinzip lässt sich wie folgt charakterisieren (Abb. 1).

Der zu verstärkende Druck P_p (Primärdruck) auf der Membrankapsel M_1 sperrt den aus der Düse D über den Widerstand W fließenden Luftstrom und bewirkt einen Staudruck (Sekundärdruck), der an der Membrankapsel M_2 angezeigt wird. Der Sekundärdruck wächst linear mit dem Primärdruck. Es resultiert eine Verstärkung, die approximativ durch das Flächenverhältnis Membran M_1 :Düsenquerschnitt Dq bestimmt ist. Der tatsächliche Verstärkungsgrad beträgt lediglich 1/7–1/10 des theoretisch zu erwartenden Wertes. Diese Divergenz ist auf die nach unten wirkende elastische Gegenspannung der Membran M_1 und den Unterschied zwischen Austrittsquerschnitt der Düse und dem effektiven Wirkungsbeereich der Sekundärkraft zurückzuführen. Als Mass der Trägheit gilt nach den Untersuchungen von WILBRANDT² und Mitarbeitern die Halbanstiegszeit des Sekundär-

druckes bei Anstieg des primären zu verstärkenden Druckes, die theoretisch und experimentell von 4 Parametern abhängig ist: dem Volumen des aufzufüllenden Raumes II, der Volumnachgiebigkeit dieses Raumes, der

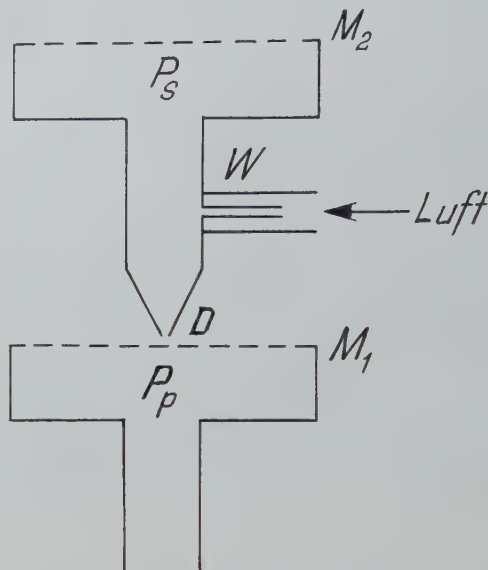


Abb. 1. P_p zu verstärkender Druck (Primärdruck), P_s zu registrierender Druck (Sekundärdruck), M_1 und M_2 Membrankapseln, D Düse, W Widerstand für Luftstrom.

Geschwindigkeit des Luftstromes und der Grösse des totalen Druckanstieges. Das Prinzip der pneumatischen Druckübertragung ist in anderer Form in den Methoden

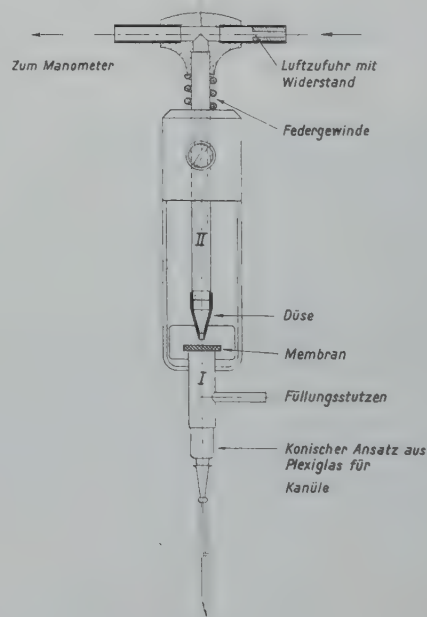


Abb. 2.

von WAGNER¹ (fortlaufende arterielle Druckschreibung am Menschen) und SCHRÖDER² (Druckregistrierung an

¹ R. WAGNER, *Methodik und Ergebnisse fortlaufender Blutdruckschreibung am Menschen* (L. Thieme, Leipzig 1942).

² W. SCHRÖDER, *Arch. Kreislaufforsch.* 15, 24 (1949); *Z. ges. exp. Med.* 117, 645 (1951).

¹ W. WILBRANDT, *Helv. Physiol. Acta* 5, 272 (1947).

² W. WILBRANDT u. Mitarb., *Helv. Physiol. Acta* 10, 171 (1952).

der vorgelagerten Karotisschlinge des Hundes, fortlaufende Druckregistrierung am Oberarm des Menschen) verwirklicht.

Unser Druckübertragungsmodell ist in Abbildung 2 dargestellt. Der unten von einem Plexiglasansatz begrenzte *Druckraum I* trägt eine seitliche Verbindung zur luftfreien Auffüllung des Systems mit physiologischer Kochsalzlösung und Heparin und als oberen Abschluss eine Gummimembran zur Düsensteuerung. Mittels eines Federgewindes sind Düsen von 1, 1,5 und 2 mm Durchmesser an die Membran anzunähern. Die Wahl der Düse richtet sich nach der erforderlichen Verstärkung und der Frequenz des zu registrierenden Druckablaufes. Der *Druckraum II* steht einerseits über den Widerstand *W* mit einer Pressluftflasche und andererseits mit dem Registriermanometer in Verbindung. Zur Aufzeichnung der Druckschwankungen steht im Prinzip der mechanische, optische und elektrische Weg offen. Die Beurteilung des Druckmessgerätes gestaltet sich gemäss folgenden Kriterien: 1. Empfindlichkeit, 2. Eigenfrequenz, 3. Dämpfung. In Abbildung 3 ist der Verlauf des Sekundärdruckes P_s in Abhängigkeit vom Primärdruck P_p bei verschiedenen Düsenquerschnitten, also bei Änderung des Flächenverhältnisses aufgetragen. Daraus geht die für unsere Zwecke hinreichende Empfindlichkeit hervor, indem bei

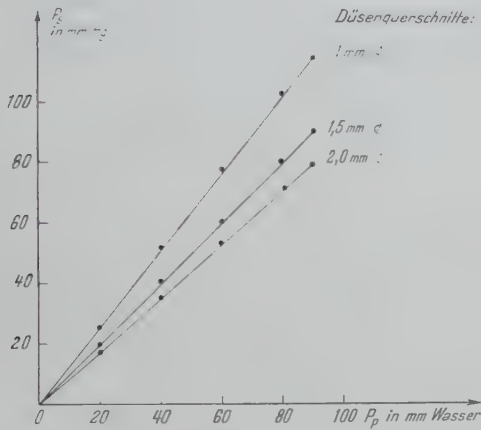


Abb. 3. Verlauf des Sekundärdruckes P_s in Abhängigkeit vom Primärdruck P_p bei Variation des Düsenquerschnittes.

einem Düsendurchmesser von 1,5 mm der Verstärkungsfaktor 13,5 beträgt. Dieser Umstand erlaubt die Verwendung relativ wenig empfindlicher, dafür trägheitsärmerer mechanischer bzw. optischer Registriermanometer. Eigenfrequenz und Dämpfung des aus 3 schwingungsfähigen Gebilden, dem Primärraum I, dem Sekun-

därraum II und dem Registriermanometer, zusammengesetzten Systems werden durch Eigenfrequenz und Einstellzeit des Registriermanometers nach oben begrenzt. Die Eigenfrequenz unserer Anordnung beträgt elektromanometrisch bestimmt 40 Hz, die Einstellzeit

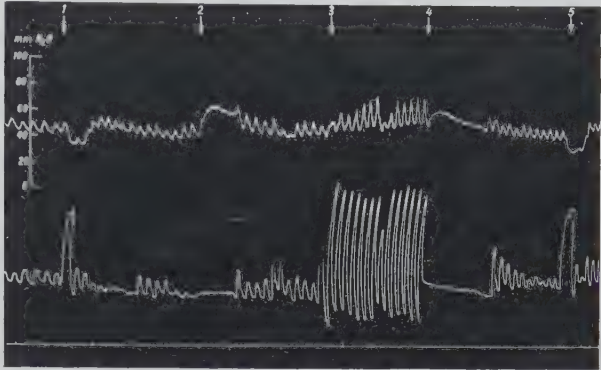


Abb. 4. Fortlaufende Druckschreibung an der Vena cubitalis des Menschen. Registrierung am Russkymographion. Obere Kurve: Venendruck. Untere Kurve: Thorakographisch registrierte Atembewegung, Inspiration nach oben. Pfeile: 1 und 5 Müllerscher Inspirationsversuch, 2 und 4 Apnoephasen, 3 Hyperpnoe. Zeitsignal 6 s.

bei einer Druckänderung von 20 mm Hg 0,07 s. – Das Verfahren eignet sich demgemäss zur getreuen Wiedergabe des peripheren venösen Druckes und seiner respiratorischen Schwankungen. Aus den in bezug auf die Trägheit der Druckübertragung gemachten Angaben ergibt sich die notwendige Folgerung, das Volumen des Sekundärdruckraumes II, das heisst Zuleitung und Manometer, möglichst klein und starr zu wählen, hingegen die Luftstromgeschwindigkeit möglichst hoch anzusetzen. Abbildung 4 zeigt den Druckverlauf in der *Vena cubitalis* des Menschen in Abhängigkeit von der Respiration.

K. LOTTENBACH, B. NOELPP und
J. NOELPP-ESCHENHAGEN

Medizinische Universitätsklinik, Zürich, den 26. September 1952.

Summary

A method is described for recording venous pressure in man and experimental animals. The apparatus is based on the pressure variations in a pneumatic system, induced by the manometer membrane throttling the outlet of the system, fed by a constant pressure air stream. This method gives a linear amplification of pressures, with direct optical or mechanical registration.

Nouveaux livres - Buchbesprechungen - Recensioni - Reviews

Statistical Decision Functions

By ABRAHAM WALD

IX and 179 pages

(John Wiley & Sons, Inc., New York, 1950)
(\$5.00)

WALDS Entscheidungsfunktionen sind vor allem als ein wesentlicher Beitrag zum Problem, aus Beobachtungen Schlüsse zu ziehen, zu werten. Mit den Versuchen, die wir ausführen, den Beobachtungen, die wir anstellen, verfolgen wir den Zweck, eine Grundlage für unsere Massnahmen zu gewinnen. Es liegt nahe, statt, wie bisher meist üblich, uns bei unsern Entschlüssen auf die Ergebnisse eines einzigen Schrittes zu stützen, den Versuch in mehreren Schritten durchzuführen und die Beobachtungen der vorhergehenden Schritte als bestimmend dafür anzunehmen, ob und welche weiteren Schritte auszuführen sind. WALD gibt nun, unter Heranziehung von Zufallsprozessen, diesem Vorgehen eine mathematische Fassung in Form seiner Entscheidungsfunktionen. Er betrachtet die möglichen Klassen von Entscheidungen samt den damit verbundenen Risiken und wählt die einzelnen Schritte so, dass das zu erwartende Risiko minimal wird. Durch die Wahl von Verteilungs- und Risikofunktionen kommt ein aprioristisches Element in die Überlegungen hinein.

WALDS Theorie befreit, wenigstens grundsätzlich, die bisherigen statistischen Theorien von den ihnen anhaftenden Beschränkungen, indem sie statt des einfachen Prüfens von Hypothesen (einfache Alternativen) mehrfache Alternativen zulässt. Die Versuche können, wie erwähnt, in mehreren Schritten durchgeführt werden. R. A. FISHERS und J. NEYMANS Theorie der Punkt- und Intervallschätzung von Parametern statistischer Verteilungen gehen als Spezialfälle in WALDS Theorie ein, ebenso R. A. FISHERS Theorie des Planens von Versuchen.

Das Buch rückt allgemeine Gesichtspunkte und Methoden in den Vordergrund. Demgemäss befasst es sich hauptsächlich mit Existenzsätzen über vollständige Klassen von Entscheidungsfunktionen. Als Hilfsmittel werden Wahrscheinlichkeitsverteilungen in unendlich-dimensionalen Räumen und einige Sätze über Mass- und Integrationstheorie benützt.

Für den praktischen Problemen zugewandten Statistiker dürften besonders das erste und fünfte Kapitel von Interesse sein, wo die allgemeinen Ideen auseinandergesetzt bzw. einfache Anwendungen der Theorie besprochen werden. Obwohl zu sagen ist, dass die Anwendung auf konkrete Probleme der praktischen Statistik in mancher Beziehung noch in den Anfängen steckt und das meiste noch zu tun bleibt, so kann die industrielle Qualitätsüberwachung mittels der fortschreitenden Tests als schöne, in ihrer Ausgestaltung ebenfalls weitgehend WALD zu verdankende Frucht der neuen Ideen betrachtet werden. Abgesehen davon, dass WALDS Entscheidungsfunktionen für manches statistische Problem Lösungen verheissen, das mit den bisherigen Methoden nur unbefriedigt angegangen werden konnte, werden sie nicht verfehlen, die Betrachtungsweise statistischer Probleme tiefgreifend zu beeinflussen.

A. KÄELIN

Advances in Electronics

Ed. L. MARTON, National Bureau of Standards,
Washington

Vol. 1, 475 and XI pages, 168 figures
(Academic Press, Inc., New York, 1948)
(\$9.00)

«Electronics» ist ein sehr gebräuchlicher, aber etwas unbestimmter Begriff, der deshalb im Vorwort des Buches näher erläutert und im folgenden Sinne verstanden wird:

- a) Physical Electronics: Emission, Ablenkung, Raumladungseffekte, Wechselwirkungen irgendwelcher geladener Partikel;
- b) Engineering Electronics: Methoden und Instrumente zur praktischen Anwendung geladener Teilchen.

Advances in Electronics ist der erste Band einer Buchreihe, die jedes Jahr in zusammenfassenden Artikeln eine Orientierung über den Stand einzelner Fachgebiete, der im obigen Sinne verstandenen «Electronics», vermitteln will, ähnlich wie dies in der Physik in den «Ergebnissen der exakten Naturwissenschaften» der Fall ist. Ein solches Werk ist sicher zu begrüßen, da bei der heute weitgehenden Spezialisierung eine Orientierung über die Nachbarggebiete nur von Vorteil sein kann. Der vorliegende erste Band enthält die folgenden 10 Übersichtsreferate.

1. Oxide Coated Cathodes (A. S. EISENSTEIN, University of Missouri).
2. Secondary Electron Emission (K. G. MCKAY, Bell Telephone Lab.).
3. Television Pickup Tubes and the Problem of Vision (A. ROSE, R.C.A.).
4. The Deflection of Beams of Charged Particles (R. G. E. HUTTER, Sylvania).
5. Modern Mass Spectroscopy (M. G. INGRAM, Argonne National Lab.).
6. Particle Accelerators (M. S. LIVINGSTON, Brookhaven National Lab.).
7. Ionospheric Research (A. G. McNISH, National Bureau of Standards).
8. Cosmic Radio Noise (J. W. HERBSTREIT, National Bureau of Standards).
9. Propagation in the FM Broadcast Band (K. A. NORTON, National Bureau of Standard).
10. Electronic Aids to Navigation (J. A. PIERCE, Harvard University).

Die einzelnen Fachgebiete sind zum Teil ausgezeichnet dargestellt, so beispielsweise das Referat von A. S. LIVINGSTON über die in der Kernphysik sehr aktuellen Maschinen zur Erzeugung energiereicher Teilchen. Es ist indessen unmöglich, in diesem Rahmen jeden interessanten Einzelbeitrag kritisch zu würdigen. Auf alle Fälle ist festzuhalten, dass dieses jährlich erscheinende Buch einem Bedürfnis entspricht, und der Leser wird an Hand der obigen Liste ersehen können, ob sich ein Gebiet darin findet, welches sein spezielles Interesse erweckt, und ob der Autor für eine kritische Übersicht und Literaturzusammenstellung Gewähr bietet.

E. BALDINGER

Spectrochemical Analysis

Arranged particularly for the D. C. arc analysis of minerals, rocks and soils and applicable also to ceramic materials, refractories, slag, biological ash and powders in general

By L. H. AHRENS

(Addison-Wesley, Cambridge, USA., 1950)

Preis ca. sFr. 50.—

In den letzten Jahren ist eine ganze Anzahl Bücher über die Grundlagen und Anwendungen der spektrochemischen Materialanalyse erschienen. Diese liessen indessen das grosse Bedürfnis nach umfassenden Darstellungen von spektrochemischen Analysen in spezifischen Teilgebieten der naturwissenschaftlichen Forschung offen. AHRENS' auf Weihnachten 1950 erschienen Buch beginnt als eines der ersten, diese Lücke auszufüllen, indem es hauptsächlich den Interessen der Petrographie, Mineralogie, Metallurgie und zum Teil der Biologie entgegenkommt.

Das Buch weist zwei Hauptteile auf. Der erste entspricht grossenteils einer Vorlesung des Autors über Spectrochemical Analysis am Massachusetts Institute of Technology. Es umfasst Theorie, allgemeine Prinzipien, Analysentechnik und andere Grundlagen der spektrochemischen Analyse. Es wird fast ausschliesslich nur Bezug auf den Gleichstrom-Lichtbogen genommen. Der zweite Teil umfasst die Spektrochemie von 70 Elementen. Die Instrumentenbeschreibung ist absichtlich weggelassen worden, da hierfür hinreichende Literatur besteht. Jeder Einzelbeschreibung der Elementanalyse wird ein kurzer Überblick über einige der gebräuchlichsten Analysenmethoden vorausgeschickt. Eine willkommene Hilfe für den Analytiker bilden auch die kurzen, zusammenfassenden Anmerkungen über die geochemische Verteilung eines jeden Elementes.

Die ungefähr 500 Publikationen umfassende Bibliographie enthält als erste eine vollständige Liste der Einzelarbeiten über die Spektralanalyse der einzelnen Elemente (ungefähr 300 Arbeiten, wobei zu bedenken ist, dass viele russische Arbeiten nicht erhältlich waren). Dies ist eine wertvolle Ergänzung des schon bestehenden *Index to the Literature on Spectrochemical Analysis*, 1. und 2. Teil (MEGGERS und SCRIBNER, 1941 und 1947), insbesondere bezüglich der Arbeiten über Messungen von Lichtbogentemperaturen. – Als Anhang finden wir einen alphabetischen Atlas der Wellenlängen für 70 Elemente und das periodische System der Elemente. Die Wellenlängen sind den M.I.T. Wavelength Tables (HARRISON, 1939) entnommen und enthalten wichtige Korrekturen für In und Nd. Ein grosser Vorteil den M.I.T. Tables gegenüber ist die praktische neue Anordnung. Wir finden den Wellenlängen eines bestimmten Emissionsspektrums gegenüber gleich die am nächsten liegenden, massgeblichen Linien verwandter Elemente.

Wie in seinen Vorlesungen, so kommt auch im vorliegenden Buch AHRENS' grosses didaktisches Geschick zum Ausdruck, vor allem in der klaren Gliederung und im einfachen Satzbau. Die grosse praktische Bedeutung des Buches wird vor allem dem Mineral- und Gesteinsanalytiker bewusst werden. Es sollte die Skepsis derjenigen Analytiker, welche gegenüber der quantitativen spektrochemischen Gesteinsanalyse immer noch Zweifel hegen, endgültig brechen. Es wird deutlich gezeigt, wie die meisten Komponenten einer gewöhnlichen Gesteinsanalyse (ausgenommen Si, Fe^{II} und P) auf spektrochemischem Weg zum grossen Teil mit gleicher Genauigkeit wie durch die gewöhnliche Silikatanalyse, in jedem

Falle aber viel schneller quantitativ ermittelt werden können. Von den weiteren Vorteilen gegenüber der chemischen Analyse seien nur noch zwei genannt: einwandfreie Kontrollierbarkeit und Reproduzierbarkeit; durch einen Arbeitsgang können gleich die Daten für mehrere Elemente ermittelt werden, und zwar vor allem auch für zahlreiche Spurenelemente.

AHRENS' Buch über die spektrochemische Analyse hilft wesentlich mit, der mineralchemischen, geochemisch-geologischen Forschung neue, man möchte fast sagen unendlich vielversprechende Möglichkeiten zu eröffnen, und man steht bei der Lektüre mit dem Autor staunend und begeistert vor den eröffneten Toren zu neuen Geheimnissen der Natur.

G. CH. AMSTUTZ

Chemistry of Carbon Compounds

Edited by E. H. RODD

Volume IA. 777 pages with 16 figures

(Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1951)

(£7.-, bei Subskription £6.-)

Seit die bekannten Standardwerke von MEYER-JACOBSON und RICHTER-ANSCHÜTZ veraltet sind, spürt der organische Chemiker den Mangel an einer modernen, das ganze Fachsystematisch behandelnden Darstellung, die im Umfang zwischen den für den Unterricht bestimmten Lehrbüchern und den lexikalischen Nachschlagewerken steht, immer stärker. Das Roddsche Werk, das diese Lücke schliesst, soll in 5 Bänden erscheinen, von denen jedoch bereits der erste geteilt werden musste; Teil A liegt nun vor.

Es ist für den Stand unserer Wissenschaft bezeichnend, dass ein solches Werk heute nur noch von einer umfangreichen Equipe spezialisierter Autoren geschrieben werden kann; für den vorliegenden Teil zeichnen nicht weniger als 23 Verfasser für 22 Kapitel von unterschiedlicher Länge, aber durchweg sehr gutem Niveau. Es wird die wichtigste Aufgabe des Herausgebers sein, für Gleichmässigkeit zu sorgen. In 11 in sich geschlossenen einleitenden Kapiteln werden die Grundlagen der organischen Chemie besprochen, sowohl Analysenmethoden als auch moderne Theorien, zum Teil von hervorragenden Spezialisten geschildert (Reaktionsmechanismen von HUGHES, Radikale von HEY und WATERS). Der darauf beginnende systematische Teil umfasst die erste Hälfte der Aliphaten und lehnt sich in der Stoffeinteilung eng an das bewährte System von RICHTER-ANSCHÜTZ an.

Alle Kapitel sind klar geschrieben und weisen zahlreiche Literaturzitate auf, meist bis 1950 reichend; zusammenfassende Aufsätze sind gebührend berücksichtigt. Es ist nicht daran zu zweifeln, dass das Werk, das einem dringenden Bedürfnis entspricht, ein wichtiges Hilfsmittel des Organikers zu werden verspricht.

H. DAHN

Medicinal Chemistry

By ALFRED BURGER

2 volumes, 1084 pages

(Interscience Publishers Inc., New York and London, 1951)

(§ 20.-)

Die Abschnitte über physikalische Eigenschaften und biologische Aktivität hat der Verfasser besonders eingehend bearbeitet, wobei er sämtliche Kenntnisse und

Auffassungen über Konstitution und Wirkung wiedergibt. So sind auch die älteren Vorstellungen EHRЛИCHS wie die moderneren Ansichten über die «Verdrängungstheorie» von Fermenten in gleichem Masse berücksichtigt. Jeder Forscher und Lehrer, der sich mit Fragen über die Abhängigkeit der Wirkung von physikalischen und chemischen Eigenschaften befasst, wird alles finden, was bis heute an Tatsachenmaterial gesammelt und an Hypothesen aufgestellt wurde. — In dem Werk von BURGER werden alle Heilmittel, die auf empirischem Wege gefunden oder durch künstliche Verfahren hergestellt wurden, genau beschrieben, in Strukturformeln wiedergegeben und in ihren Synthesen geschildert. Das detaillierte Eingehen gilt für alle Pharmaka, gleichgültig, ob es sich um Analeptika, Analgetika, Hypnotika, Vitamine, Hormone, Chemotherapeutika, Antibiotika oder um andere Mittel handelt. Die Gründlichkeit, mit der die für die Pharmakologie so wichtigen Fragen, wie Intoleranz und Arzneiresistenz und ihre Entstehung, behandelt werden, geht aus dem Text und aus der gewissenhaft zitierten Literatur hervor, in der mit selten anzutreffender Vollständigkeit alle Hinweise mit Anführung und Patentschriften, Einzelarbeiten, Monographien und Lehrbüchern enthalten sind. Wenn man berücksichtigt, dass jeder als Medikament in Betracht kommende oder als solcher benutzte Stoff unter den verschiedensten Gesichtspunkten, wie Prüfung *in vitro*, Verhalten im Experiment und beim Menschen, besprochen wird, kommt man zu dem Ergebnis, dass mit der Herausgabe des Werkes von BURGER nicht eine Lücke ausgefüllt ist, sondern dass mehrere grosse Lücken beseitigt wurden. Gab es doch bisher keine Zusammenfassung, in der gleichzeitig die Anwendung aller bekannten Medikamente, die Art ihrer Wirkung und der Gang der Synthesen beschrieben sind. Weite, Qualität und didaktische Gestaltung der Abhandlung von BURGER sind derart,

dass Übersetzungen in andere Sprachen hoffentlich erfolgen werden.
E. BERGER

Klinische Pathologie der Blutkrankheiten

VON R. SCHOEN UND W. TISCHENDORF

521 Seiten, 101 zum Teil mehrfarbige Abbildungen
(Verlag G. Thieme, Stuttgart 1950)

Die Autoren haben es unternommen, hier die Hämatologie nicht in erster Linie als Spezialgebiet, sondern im Rahmen der gesamten Pathologie und Klinik darzustellen. Das Buch wendet sich damit vor allem an Internisten, Pädiater und Pathologen. Die Klinik der Blutkrankheiten wird vom Gesichtspunkt der pathologischen Physiologie und der Pathogenese aus erörtert und vermittelt eine fruchtbare Vereinigung von Theorie und klinischer Symptomatologie. Wenn von anderer Seite in der Besprechung dieses Buches gewisse allzu spezialistische Details vermisst wurden, so sehen wir gerade in der Scheidung von Wesentlichem und Unwesentlichem einen bedeutenden Vorteil der Darstellung für den hämatologisch nicht spezialisierten Leser. Besonders hervorzuheben sind die Kapitel über vergleichende Phylogenese und Ontogenese der Blutbildung, die nach modernen Gesichtspunkten dargestellte Klinik der hämolytischen Anämien und die ätiologisch gegliederte Einteilung der Blutungskrankheiten, ferner die Besprechung der leukämoiden Reaktionen. Die Illustrationen sind sehr gut und enthalten zum Teil mehrfarbige Mikrophotographien. Jedes Kapitel schliesst mit einem ausführlichen Literaturverzeichnis, welches die neuesten Arbeiten bis zum Erscheinungsjahr des Buches enthält.

H. LÜDIN

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

NOVA

En mars 1953, les Editions Birkhäuser S.A., Bâle, feront paraître:

EXPERIENTIA - Supplementum I

contenant la totalité des conférences et discussions tenues du 1^{er} au 4 octobre 1952 à Bâle lors du Symposium sur les problèmes actuels de la nutrition.

Im März 1953 erscheint im Verlag Birkhäuser AG., Basel:

EXPERIENTIA - Supplementum I

mit sämtlichen Vorträgen und Diskussionsbemerkungen des Symposiums über Gegenwartsprobleme der Ernährungsforschung (gehalten in Basel vom 1. bis 4. Oktober 1952).

In March 1953, the Verlag Birkhäuser AG., Basle, will publish:

EXPERIENTIA - Supplementum I

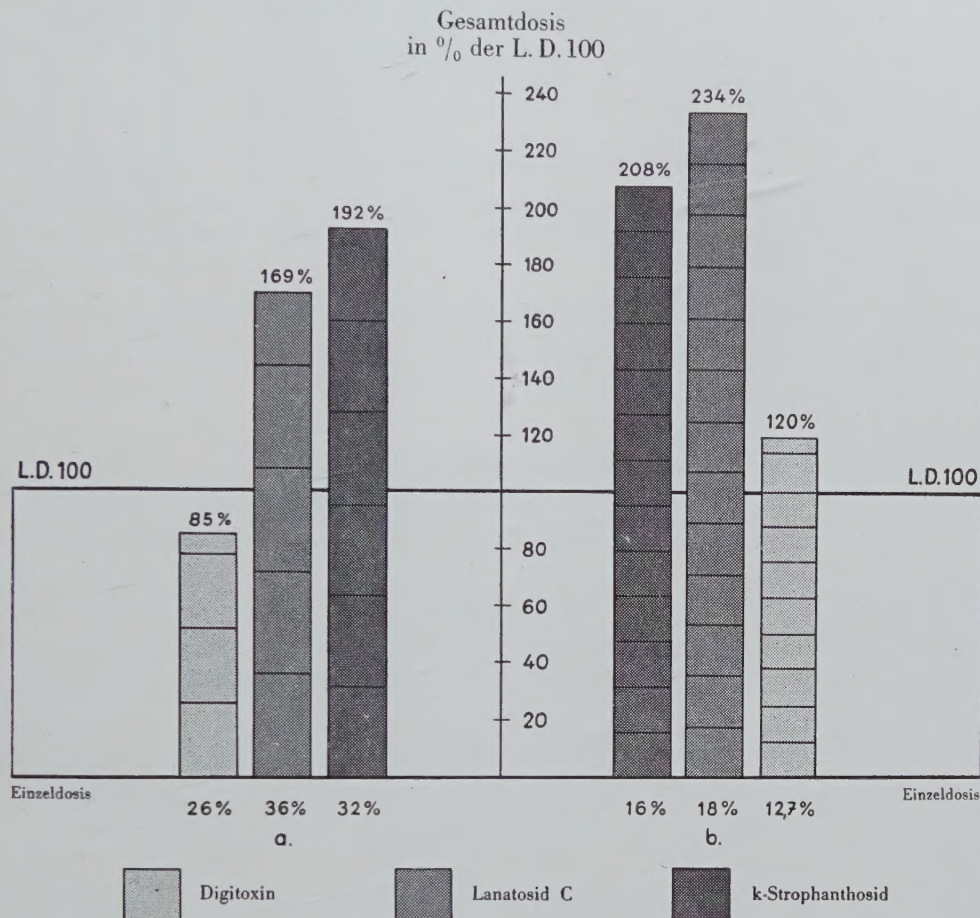
giving the lectures and discussion remarks of the Symposium on Present Problems of Nutrition Research (Basle, October 1st—4th, 1952).

In Marzo 1953 apparirà presso la Casa Editrice S.A. Birkhäuser, Basilea,

EXPERIENTIA - Supplementum I

con tutte le conferenze e le discussioni del Simposio sui problemi attuali della ricerca sulla nutrizione (tenuto a Basilea dal 1^o al 4 ottobre 1952).

Mit den pharmakologischen Untersuchungen in den Laboratorien der Sandoz A.G. wurde ein wesentlicher Beitrag zur Differenzierung der verschiedenen herzwirksamen Glycoside geleistet.



Relative toxische Kumulation herzwirksamer Glycoside bei chronischer Verabreichung am Ganztier. Es wird diejenige Gesamtmenge eines herzwirksamen Glycosides, welche zum Tod des Tieres führt, verglichen mit der einmaligen letalen Infusionsdosis nach *Hatcher*

- bei Verabreichung von grösseren Einzeldosen,
- bei Verabreichung von kleineren Einzeldosen.

Die Versuche demonstrieren die geringe relative toxische Kumulation von Lanatosid C und k-Strophanthosid.

Suter E., Rothlin E. und Bircher R.: „Glykosidwirkung auf Elektrokardiogramm und Myokard“.
Helv. Physiol. Acta 7, 1, 1949

SANDOZ A.G. - BASEL



Lehrbücher und Monographien aus dem Gebiete der exakten Wissenschaften

Reihe der experimentellen Biologie

Pflanzliche Infektionslehre

Lehrbuch der allgemeinen Pflanzenpathologie. Von Prof. Dr. E. GÄUMANN, ETH., Zürich. 681 Seiten mit 467 Figuren. (1951) Ganzleinen Fr. 46.30.

Einführung in die physiologische Embryologie

Von Prof. Dr. F. E. LEHMANN, Universität Bern. 414 Seiten mit 132 Figuren und 17 Tabellen. (1946) Ganzleinen Fr. 39.50.

Die Signalübermittlung im Nerven

Von Prof. Dr. A. VON MURALT, Universität Bern. 354 Seiten mit 132 Figuren, 3 mehrfarbigen Tafeln und 24 Tabellen. (1946) Ganzleinen Fr. 43.70.

Die Pilze

Grundzüge ihrer Entwicklungsgeschichte und Morphologie. Von Prof. Dr. ERNST GÄUMANN, ETH., Zürich. 382 Seiten mit 440 Figuren. (1949) Ganzleinen Fr. 39.50.

Grundriss zu einer Balneobiologie der Thermen

Von Prof. Dr. VALE VOUK, Universität Zagreb. 88 Seiten mit 22 Figuren. (1950) Ganzleinen Fr. 14.55.

Vergleichende Physiologie

in 6 Bänden. Von Prof. Dr. W. VON BUDDENBROCK, Universität Mainz.

Band I: *Physiologie der Sinnesorgane*. 504 Seiten mit 256 Figuren. (1952) Ganzleinen Fr. 45.75. – Band II: *Physiologie des Nervensystems*. Zirka 300 Seiten mit zirka 200 Fig. Erscheint 1953. – Band III: *Ernährungsphysiologie*. Befindet sich in Vorbereitung. Band IV: *Hormone*. 492 Seiten, 115 Fig. und 106 Tabellen. (1950) Ganzleinen Fr. 49.40.

Endosymbiose der Tiere mit pflanzlichen Mikroorganismen

Von Prof. Dr. P. BUCHNER, vormals Universität Leipzig. Zirka 600 Seiten mit zirka 340 Figuren. Erscheint 1953.

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung

Verlag Birkhäuser · Basel und Stuttgart